

Aleix Ferré Mateu

**COMPARACIÓ DE DOS MÈTODES ANALÍTICS PER LA
DETERMINACIÓ DE XANTOFIL·LES TOTALS**

TREBALL DE FI DE GRAU

Grau de Química



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Reus

2015

RESUM

En el present treball s'han comparat dos mètodes analítics per la determinació de xantofil·les totals. S'ha realitzat una anàlisi detallat de les variacions en la composició quantitativa de les xantofil·les i carotens d'una mostra proporcionada per l'empresa. Els pigments extrets van ser separats i identificats mitjançant tècniques espectrofotomètriques i cromatogràfiques. El contingut de xantofil·les totals en el mètode oficial va ser de 39.77 mg de *trans*-luteïna/g de mostra i en el mètode Novus de 40.39 mg de *trans*-luteïna/g. Per carotens, el mètode oficial 0.673 mg de β -carotè/g de mostra i el mètode de l'empresa 0.115 mg de β -carotè/g de mostra. Els compostos identificats van ser el β -carotè, la *trans*-luteïna, la *trans*-zeaxantina i isòmers cis. Els compost majoritari, per a les xantofil·les, va ser la *trans*-luteïna (91%) i per als carotens, el β -carotè (0.27%). L'estabilitat dels pigments es va avaluar respecte a la temperatura, la il·luminació (llum o foscor), el temps d'anàlisi i la presència d'antioxidants (BHT), tenint com a variable de resposta la concentració de carotenoides presents.

Els resultats estadístics realitzats mostren que les diferències per a les xantofil·les totals no són significatives per un valor de $\alpha = 0.05$. En canvi, pels carotens totals si que ho són.

ABSTRACT

In the present study we have compared two analytical methods for the determination of total xanthophylls. We have performed a detailed analysis of changes in the composition and quantity of carotenes and xanthophylls a sample.

The extracted pigments were separated and identified by spectrophotometry and chromatography. The identified compounds were β -carotene, trans-lutein, zeaxanthin and lutein isomers cis. The most abundant compounds were lutein (91%) and zeaxanthin (5%). Pigment stability in the extract with respect to temperature, illumination (light and darkness) and antioxidant addition was evaluated (BHT).

The statistical results show that the determination of total xanthophylls for both methods are not significant different for a value of $\alpha = 0.05$. However, for total carotenoids results were not comparables.

AGRAÏMENTS

La realització d'aquest treball de fi de grau no hauria estat possible sense la col·laboració, suport i ajuda de moltes persones.

Voldria agrair en primer lloc a en David Ribera, tutor professional de l'empresa Novus, per dedicar-me el seu temps i donar-me bona part de la informació que he necessitat per poder realitzar el treball. També a l'Antonio, l'Ana i el Delfín per la seva col·laboració i paciència.

Al Sergio Castellón, tutor acadèmic de la facultat de Química, per les directrius i les pautes ha seguir alhora d'estructurar el treball.

Agraeixo a la Clàudia Vilanova, Teresa Mateu i Mireia Ferré el seu suport incondicional i el seu ajut que m'han transmès al llarg del treball, per aguantar-me durant aquests mesos de mal humor i donant-me els ànims necessaris en els moments més difícils. I agrair-los també la informació que em van facilitar per realitzar part del treball.

Agraeixo, també, a qui ha estat en tot moment al meu costat, llegint, rellegint, retocant i donant-me ànims quan més a prop del final estava. Per la seva col·laboració, seguint en tot moment les seves indicacions que m'han ajudat a perfeccionar aquest treball.

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ.....	6
1.1. Empresa Novus	6
1.2. Presentació i motivació del treball.....	7
1.3. Els carotenoids.....	8
1. Història de la Química dels carotenoides	8
2. Origen i distribució natural	9
3. Estructura química i classificació	11
4. Paper dels carotenoides.....	13
2. ANTECEDENTS D'ANÀLISI DE CAROTENOIDES.....	15
2.1. Mostreig.....	15
2.2. Extracció	15
2.3. Precaucions en el maneig de la mostra.....	16
2.4. Saponificació	18
2.5. Separació	19
2.6. Identificació.....	20
2.7. Quantificació.....	21

3. OBJECTIU DEL TREBALL	22
4. EXPERIMENTAL.....	23
4.1. Mètode AOAC	23
4.2. Mètode Novus	27
5. RESULTATS I DISCUSSIÓ	29
5.1. Xantofil·les totals.....	30
5.2. Carotens totals	35
5.3. Estudi amb antioxidants	38
6. CONCLUSIONS.....	39
7. BIBLIOGRAFIA/WEBGRAFIA	41
8. ANNEXOS	43

1. INTRODUCCIÓ

El color és el primer sentit que es percep d'un aliment i el que determinarà el primer judici sobre la seva qualitat, ja que tendeix algunes vegades a modificar altres sentits com el gust i l'olfacte, condicionant l'èxit o el fracàs d'un producte en el mercat.

L'estudi de carotenoides ha cobrat major importància no només per l'activitat de la provitamina A (compost que els animals i els humans converteixen en vitamina A per un sistema enzimàtic oxidatiu) d'alguns d'ells, sinó també degut al seu paper com a antioxidants, el que s'ha associat amb la prevenció d'alguns tipus de càncer.

Els carotenoides sempre han estat part de la dieta diària dels animals i dels éssers humans. Amb el desenvolupament de l'alimentació animal optimitzada, la indústria ha creat eines per formular la seva alimentació en els millors costos per proporcionar animals amb els nutrients requerits. Els carotenoides s'inclouen en l'alimentació com a part dels nutrients que donen suport a la salut animal, així com la qualitat del producte.

S'han desenvolupat noves formes de carotenoides concentrats dels quals se'n proporcionen suficients als animals, en benefici d'aquests i dels seus consumidors finals. Amb el desenvolupament dels reglaments, aquests productes es van convertir en additius per a pinsos a la Unió Europea (UE) a partir de 1970 (Amaya, Becquet, Carné, Miralles i Peris, 2014).

Donada la urgent necessitat de colorants naturals per a aliments, cal recórrer a l'estudi de noves fonts de colorants d'aquest tipus, a partir de matèries primeres de la regió o d'espècies que siguin fàcilment adaptables al clima, de fàcil propagació i de baix cost.

1.1. Empresa Novus

Es tracta d'una multinacional amb la seva seu central a Saint Louis (Estats Units), que es dedica a l'elaboració de productes de salut i nutrició animal. A Reus hi ha el centre de Recerca i Desenvolupament d'Europa. El nou centre de R+D està destinat a promoure la innovació de nous productes, especialment en el sector dels pigments, olis essencials, antioxidants i àcids orgànics.

Una altra activitat clau del centre és la producció de pigments carotenoides, una substància que es pot barrejar amb l'alimentació dels animals per millorar el valor nutricional, el color de la carn i el ous que produeixen.

1.2. Presentació i motivació del treball

L'empresa Novus és on vaig realitzar les pràctiques externes. El sector en el que vaig treballar es dedica a l'estudi i investigació de nous productes; les tasques a desenvolupar, majoritàriament, van ser anàlisis de carotenoides i xantofil·les. Després d'estar-hi treballant diàriament i fins el punt de familiaritzant-me, no puc negar la curiositat que em van despertar aquests productes. La idea de poder realitzar un treball que tractés sobre els carotenoides (concretament, les xantofil·les) em seduïa molt, i més encara quan després de realitzar un seguit de reunions i reflexions amb el meu tutor, el Dr. David Ribera Ruiz, vam entreveure que podia ser un tema molt interessant i apassionant.

A mesura que començo a llegir i a documentar-me sobre els carotenoides, la seva història, la seva distribució natural, la seva classificació i la seva estructura química, és evident que es tracta de productes que han despertat l'interès d'investigadors de diferents àrees del coneixement, incloent la química, la bioquímica, la biologia, ciència i tecnologia dels aliments, medicina, farmàcia i nutrició. D'aquesta manera, el coneixement científic realitza un paper molt important dins aquest àmbit.

Després de la recerca bibliogràfica em dispo a endinsar-me en profunditat en l'estudi comparatiu de dos mètodes químics per determinar el contingut de xantofil·les totals, i fer el treball que aquí presento.

El treball es pot dividir en dues parts:

1. La primera part teòrica. Tota la informació d'aquesta part es va extreure de llibres especialitzats i de la recerca d'Internet.
2. I la segona part experimental centrada en la comparació de dos mètodes analítics i la discussió de resultats. Informació consultada d'articles científics i diverses publicacions bibliogràfiques.

L'elaboració d'un treball en un camp obert a la investigació, per desenvolupar i per innovar, ha suposat per a mi un repte. Mai havia fet una cosa semblant i, la veritat és que no sabia per on començar ni si me'n sortiria. Una segona dificultat va ser buscar la informació, fer el redactat i estructurar-lo. Personalment, em costa molt redactar, puntuar correctament, incloure els connectors textuais per introduir les idees i relacionar-les, equilibrar els paràgrafs, etc. De vegades, l'escriptura la comparo amb les excursions a la muntanya. De bon començament, la pàgina en blanc, els nervis, el respecte a coses desconegudes, la desorientació... finalment, quan es comença a tirar pels senderons,

tot va rodar. Així, cada vegada que tinc una nova ruta és com si fos sempre la primera vegada. De cop ets un sac de nervis, el pas és cautelós i fluix, no gosses imposar el propi ritme. Quan ets a dalt i tot ha sortit bé, no recordes que has avançat pel senderó i el que es feia insuportable i cara amunt, ara s'analitza amb una intensitat i una perspectiva diferent. Per aquest motiu la imatge de la portada del treball està ambientada en la relació entre la muntanya i els espectres d'absorció característics dels carotenoides.

1.3. Els carotenoides

1. Història de la Química dels carotenoides

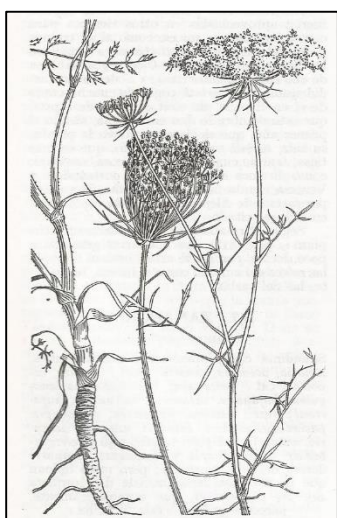


Figura 1. Pastanaga
(*Daucus carota*)

Les primeres publicacions que parlen dels pigments d'origen natural, com els carotenoides, daten de principis del segle XIX. Aquestes es refereixen als colorants alimentaris coneguts com el pebrot vermell o pebre vermell, el safrà, la pastanaga, etc. (Britton, Liaaen-Jensen, Pfander, 1995). Des de Berzelius (Mayer, 1950) s'han investigat els carotenoides i acumulat una gran quantitat d'informació sobre la seva localització, reconeixement i propietats físiques. Willstätter (Mayer, 1950) i els seus col·laboradors van ser els primers que van aconseguir aïllar compostos vegetals i establir la seva composició, tot i que Willstätter va dubtar de la homogeneïtat d'alguna de les seves preparacions, dubte que més tard es va mostrar justificada.

No obstant, els mètodes elaborats per aquest formen la base de la investigació actual. Es va produir un avanç important en aquest sentit quan Zechmeister va demostrar per hidrogenació catalítica que els carotens contenen una estructura essencialment alifàtica. Karrer va arribar, quasi simultàniament, a aquesta conclusió però amb la crocetina (component que es troba en el safrà).

Però la preparació per Khun de compostos poliènics sintètics amb residus aromàtics en els dos extrems de la cadena i la seva semblança amb els carotens, la seva absorció de la llum i la seva conducta enfront a l'àcid perbenzoic i clorur de iode, van proporcionar l'evidència convincent de la naturalesa poliènica dels pigments carotenoides. La química dels carotenoides ha estat activament investigada i molts punts han estat aclarits, particularment per Karrer, Khun i Zechmeister (Mayer, 1950).

2. Origen i distribució natural

Els carotenoides (Amaya, Becquet, Carné, Peris i Miralles, 2014) són pigments d'origen natural en gran mesura responsables de la varietat de colors compresos entre el groc i el vermell, que es troben en plantes, algues, fongs, aus, així com la carn del peix i de la cutícula dels crustacis o insectes.

Tots els teixits fotosintètics contenen carotenoides, encara que els colors d'aquests pigments amb freqüència passen desapercebuts per la clorofil·la. També, present en els cloroplasts en plantes superiors i algues, així com en la membrana externa dels bacteris fotosintètics.

De fet, els carotenoides tenen un paper clau en la fotosíntesi, ja que absorbeixen energia de la llum i també protegeixen la clorofil·la de l'oxidació causada per la llum i l'oxigen. La seva principal funció està relacionada amb les seves propietats antioxidants.

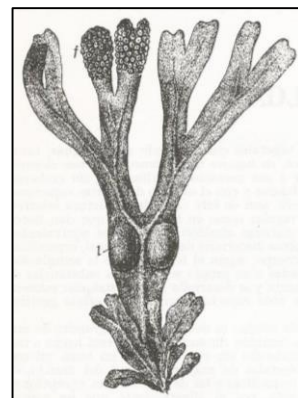


Figura 2. *Fucus vesiculosus*, amb presència de ficoxantina

En molts animals, durant l'acumulació de carotenoides a través de la dieta, els colors estan sovint modificats per la presència de carotenoproteïnes (Amaya, Becquet, Carné, Peris i Miralles, 2014), el què pot donar diferents tonalitats de verd, vermell, blau i porpra.

Les interaccions específiques amb les proteïnes, com passa en les carotenoproteïnes (Britton, Liaaen-Jensen i Pfander, 1995), poden causar un gran desplaçament de la $\lambda_{\max}$ a longituds d'ona majors (efecte batocròmic).

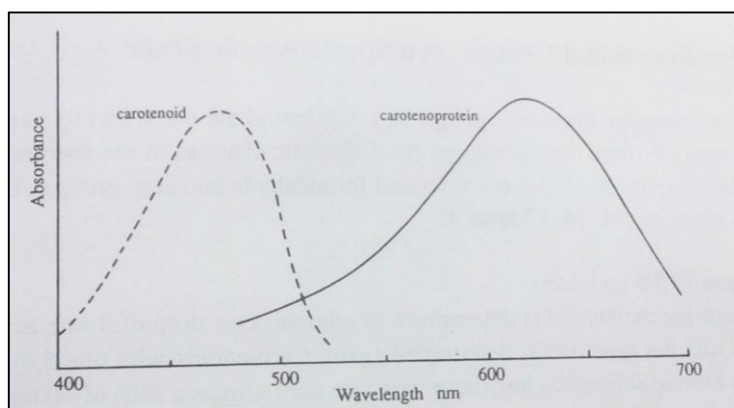


Figura 3. Espectres d'absorció d'un carenoide i del seu complex amb la proteïna.

A continuació, en la següent taula, es mostren les fonts d'alguns carotenoides en la naturalesa (Amaya, Becquet, Carné, Peris i Miralles, 2014):

Taula 1. Fonts d'alguns carotenoides en la naturalesa.

Carotenoides representatius	Fonts de carotenoides i els seus metabòlits
β-carotè	Pastanagues , fongs , algues , bacteris
Cantaxantina	Crustacis, fongs (<i>Cantharellus sp.</i>), algues
Capsantina	Pebrot vermell (<i>Capsicum annum</i>)
Criptoxantina	Fruites, carabassa, blat de moro groc, algues, préssecs, nous
Luteïna, Zeaxantina	Blat de moro groc (<i>Zea mays</i>), Marigold, alfalfa
Licopè	Alfalfa, tomàquet, síndria, papaia, aranja, guaiaba, mosqueta rosa, fongs

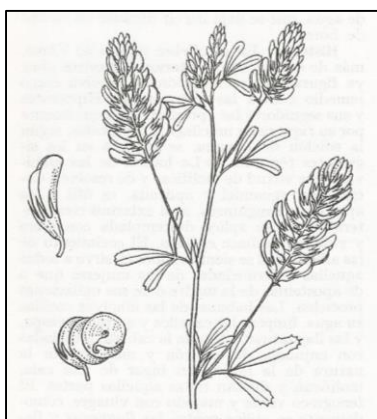


Figura 4. Alfals (*Alfalfa*)



Figura 5. Blat de moro (*Zea mays*)

3. Estructura química i classificació

Els carotenoides (Amaya, Becquet, Carné, Peris i Miralles, 2014) van ser anomenats pels seus descobridors basant-se en les seves propietats especials o el seu origen, per exemple, el carotè (de pastanagues) i la zeaxantina (blat de moro, *Zea mays*). Els subgrups principals dels carotenoides són els carotens i les xantofil·les (oxicarotenoides).

La cadena principal de la molècula es compon per la unió de vuit unitats de terpenoides (isoprenoides) de cinc àtoms de carboni cadascun, de manera que la seqüència s'inverteix en el centre (Gross, 1987). Per tant, es tracta d'un esquelet d'hidrocarbur amb la fórmula química $C_{40}H_{56}$, conjugat per l'alternança d'enllaços dobles i senzills. L'estructura i presència de dobles enllaços és el què dóna color a aquests pigments naturals.

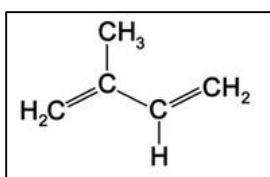


Figura 6. Isoprè

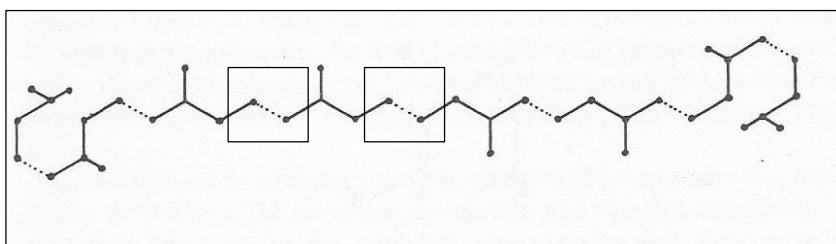
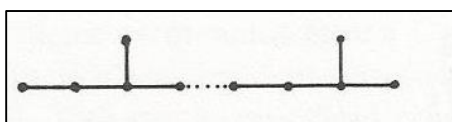
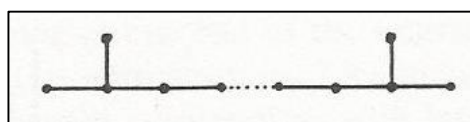


Figura 7. Unió d'unitats isoprenoides



Unió cap-cua



Unió cua-cua

La isomeria (Amaya, Becquet, Carné, Peris i Miralles, 2014) pot donar-se en cas de rotació de dobles enllaços $C=C$ al llarg de la molècula, obtenint els isòmers *trans* i *cis*. Els isòmers no només difereixen en els seus punts de fusió, solubilitat i estabilitat, sinó també en les característiques ultraviolades. Els carotenoides en la naturalesa estan compostos, predominantment, per isòmers *trans*, que són més termoestables que els isòmers *cis*. La mida i la forma de les molècules de carotenoides tenen implicacions claus en les seves propietats colorants. Tots els carotenoides de colors mostren la configuració *trans*. Com a resultat, l'estructura central del doble enllaç en les molècules

de carotenoides actua com a cromòfor que absorbeix la llum i és responsable de la intensa gamma de colors observats des del groc fins al vermell.

El nombre de dobles enllaços conjugats pot variar de set a quinze. De fet, es necessiten almenys set dobles enllaços conjugats per als carotenoides per impartir color, i aquest incrementa la intensitat quan el nombre de dobles enllaços conjugats augmenta. Els dobles enllaços conjugats de l'estructura de carotenoides també són els responsables de la capacitat d'aquests d'eliminar els radicals lliures nocius que causen l'oxidació dels teixits. Per tant, els carotenoides també s'han reconegut per tenir potents propietats antioxidants. Com a grup, els carotenoides són extremadament hidròfobs amb poca solubilitat en aigua, encara que els isòmers *cis* es solubilitzen més fàcilment. Són solubles en els dissolvents apolars i en els greixos.

Els carotenoides es poden trobar en la seva forma lliure o esterificats amb una varietat d'àcids grassos orgànics, com ara el palmític, linoleic, esteàric, etc. Les formes d'èsters són més estables, ja que estan menys subjectes a l'oxidació. No obstant, també estan menys biodisponibles.

Els carotenoides poden dividir-se en dos grups principals: els carotens i xantofil·les o oxicarotenoides. Els carotens estan fets exclusivament d'hidrocarburs i les xantofil·les són derivats del carotè que contenen diversos àtoms d'oxigen.

Carotens

Els carotens no contenen oxigen en la seva estructura molecular, generalment de color taronja. La seva estructura molecular està constituïda, exclusivament, per carboni i hidrogen formant una cadena de poliinsaturats amb fórmula química $C_{40}H_{56}$. Hi ha una varietat de carotens que estan presents en la naturalesa, encara que les pertinents a l'alimentació d'animals són principalment β -carotè i licopè.

Xantofil·les

Les xantofil·les es deriven essencialment de l'estructura principal de l'hidrocarbur del carotè; pel que fa a les funcions oxigenades més comuns trobem els grups: hidroxil (OH), aldehyd (CHO), cetones (C=O), carboxil (CO₂H) i metoxi (OCH₃). Aquests grups funcionals s'afegeixen a un o ambdós extrems de la molècula. La fórmula química

general de les xantofil·les és $C_{40}H_{56}O_{1-4}$. La presència dels grups oxigenats fa que els carotenoides siguin més solubles en aigua que els carotens. Alguns dels carotenoides en aquest grup són la luteïna, astaxantina, cantaxantina, capsantina, citranaxantina i èster etílic de l'àcid beta- apo- 8'-carotenoic.

Generalment, per anomenar els carotens s'utilitza el sufix -è i per les xantofil·les el sufix -ina. En la **taula I** de l'Annex, es troben les estructures dels principals carotenoides trobats en aliments.

4. Paper dels carotenoides

Els colors estan àmpliament presents en el regne animal, jugant un paper biològic important. Per exemple, en el cas de les aus, l'atracció i la selecció de la parella es veu afavorida pels colors brillants, senyal que són individus sans. Aquests colors provenen de la dieta animal, i estan vinculats a la presència de carotenoides. Aquests constitueixen el major grup de pigments d'origen natural, mostrant molta diversitat en la distribució natural, l'estructura i la funció. Ells són, en gran part, els responsables de la varietat de colors grocs fins als vermells en fruites, verdures, fongs, plomes d'aus, carn de peix, crustacis o cutícula dels insectes, així com les plantes aquàtiques i algues.

Les propietats dels carotenoides són un dels elements biològics més importants en la naturalesa, i són sintetitzats per tots els organismes fotosintètics, alguns bacteris i fongs. Més de 750 carotenoides han estat identificats i aproximadament 60 d'ells són precursors de la vitamina A, sent el més important el β -carotè.

Una característica dels carotenoides és la seva capacitat per absorbir llum en les regions de l'espectre visible, on la clorofil·la no és un absorbent molt eficient. Aquests absorbeixen la llum i transfereixen part de l'energia a la clorofil·la, que després l'utilitzarà per a la fotosíntesi. Tanmateix, poden protegir les plantes que estan més exposades a la llum solar.



Figura 8. Gambeta

Els carotenoides són essencials per a la supervivència d'organismes fotosintètics, ja que són antioxidants lipofílics que protegeixen les membranes cel·lulars contra l'oxidació. Ho fan mitjançant la dissipació inofensiva de l'excés d'energia que absorbeixen de la llum en forma de calor. En absència dels carotenoides, aquest excés d'energia de la llum té el

potencial de destruir proteïnes, membranes i altres molècules (Amaya, Becquet, Carné, Peris i Miralles, 2014).

Els animals són generalment incapaços de sintetitzar carotenoides i requereixen d'un consum alimentari dels productes vegetals per satisfer les demandes diàries. Els derivats dels carotenoides promouen la salut, milloren la conducta sexual (senyalització de color) i són essencials per a la reproducció.



Figura 9. Mallerenga blava
(*Parus caeruleus*)



Figura 10. Totestiu (*Parus major*)

Les longituds d'ona dels colors dels carotenoides utilitzats pel rovell d'ou (Amaya, Becquet, Carné, Peris i Miralles, 2014) comprenen entre 400 nm i 600 nm en el rang visible de l'espectre. Per l'ull humà, els compostos comprenen des del color groc al vermell.

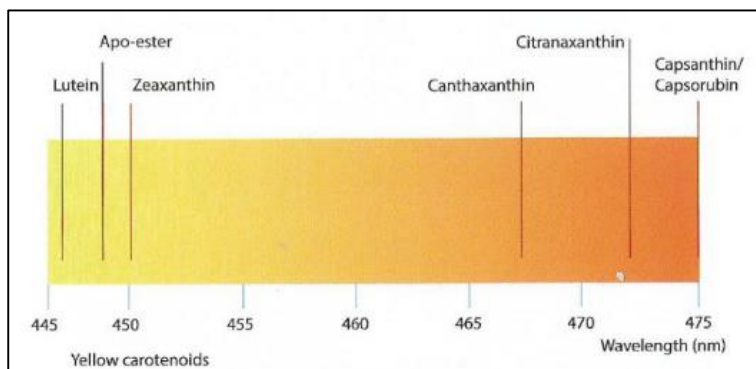


Figura 11. Longituds d'ona de diversos carotenoides

2. ANTECEDENTS D'ANÀLISI DE CAROTENOIDES

La norma aprovada per l'AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) se'n encarrega de determinar els carotens i les xantofil·les presents en els vegetals i en les mescles d'aliments. Aquesta norma estableix el mètode d'assaig per a la determinació de carotens i xantofil·les en els aliments destinats a l'alimentació animal.

S'han plantejat varis mètodes per la determinació de carotenoides en aliments que busquen millorar les deficiències del mètode oficial, com per exemple la cromatografia en capa fina i la cromatografia líquida d'alta resolució. A continuació es detallen els passos a seguir per l'anàlisi de carotenoides en aliments.

2.1. Mostreig

Per realitzar un mostreig en els aliments, per a qualsevol tipus d'anàlisi i especialment de carotenoides, és necessari tenir en consideració varis factors que poden afectar la composició dels aliments, com són el tipus de cultiu, l'estat de maduració, la composició del sòl, el clima, la part de la planta utilitzada, les condicions d'emmagatzematge, entre d'altres. En les plantes s'ha trobat variacions en una mateixa espècie, pel que es recomana obtenir cinc mostres separades de cada planta, cada una d'una font diferent per assolir un valor representatiu.

La mostra ha d'identificar-se amb les dades següents: lloc i data de recol·lecció de la mostra, nom comú, classificació taxonòmica, part de la planta col·lectada, pes de la mostra i pes de la part comestible.

2.2. Extracció

La llum afavoreix reaccions fotoquímiques que canvien l'estructura original del carotenoide (per exemple, isomerisme *cis* i *trans*) i és un factor a considerar en el moment de realitzar la seva extracció. La calor també afavoreix reaccions tèrmiques de degradació. L'aire a causa de l'oxigen afavoreix la oxigenació dels enllaços dobles a funcions epòxid, hidroxils i peròxids, entre d'altres. Per aquestes raons l'extracció dels carotenoides s'ha de realitzar en condicions d'absència de llum, a temperatura ambient o menor, i en absència d'oxigen (per exemple amb una atmosfera artificial de nitrogen).

A més s'ha de realitzar el més ràpid possible, i a partir de teixits frescos, per evitar la degradació per l'acció conjunta d'aquests factors adversos (Gross, 1987).

Degut a que els carotenoides es troben distribuïts en diferents tipus de teixits, és difícil trobar un mètode d'extracció comú. Les mostres s'han d'analitzar fresques i si no és possible, es poden guardar a -10°C . Aquestes també es poden liofilitzar, encara que aquest procediment no és recomanat, ja que pot donar pèrdues de carotenoides (Gross, 1987).

Els teixits frescos contenen un alt percentatge d'aigua, per això el solvent orgànic utilitzat per l'extracció ha de ser miscible en aigua (acetona, metanol, etanol, etc). En mostres que han estat liofilitzades es poden utilitzar dissolvents no miscibles en aigua, com l'èter dietílic. Quan s'extreu amb acetona, és important eliminar-la abans de la saponificació, ja que la presència d'acetona i carotenals en medi alcalí, dona lloc a condensacions aldòliques (Gross, 1987).

Per l'extracció, el material es talla en trossets petits i s'homogeneïtza amb acetona freda per un o dos minuts, amb una batedora elèctrica. L'extracte es passa per un filtre de vidre de porositat $3\text{ }\mu\text{m}$ a pressió reduïda, i el residu és extret novament, fins que l'extracte sigui incolor. El volum d'extracció pot reduir-se fent una extracció final amb èter de petroli en els extractes d'acetona, que ja han eliminat l'aigua de la mostra (Gross, 1987). S'han realitzat estudis agregant antioxidants i neutralitzants per realitzar l'extracció, però les diferències en els continguts de carotenoides no són significatives.

L'extracte es transfereix per fraccions a una ampolla de separació que contingui èter de petroli. S'agrega aigua o solució diluïda de clorur de sodi (NaCl) fins separar la fase aquosa i orgànica; en aquesta última s'hi troben els carotenoides. És important agregar l'extracte per petites fraccions i addicionar suficient aigua, per evitar la formació d'emulsions que porten a la pèrdua de carotenoides en la fase aquosa. L'extracte s'asseca amb sulfat de sodi anhidre (NaSO_4) i es concentra per la saponificació (Gross, 1987).

2.3. Precaucions en el maneig de la mostra

S'han de mantenir certes precaucions en el seu maneig per evitar isomeritzacions i degradacions. Entre els agents que ho poden provocar poden citar-se:

- ✓ Escalfament de la solució en un dissolvent orgànic. Durant les extraccions i les separacions per cromatografia, s'utilitzen dissolvents que després s'han d'eliminar; per això és recomanable l'ús de dissolvents de baix punt d'ebullició, i evaporar a pressió reduïda. Tot i així, no és recomanable arribar a temperatures majors de 40°C (Gross, 1987).
- ✓ Degut a la susceptibilitat dels carotenoides a ser oxidats, es recomana treballar en atmosferes inerts (nitrogen); però, per la dificultat que això presenta, s'ha optat per l'ús d'antioxidants (Gross, 1987). Entre els antioxidants més utilitzats en anàlisis de carotenoides es troben l'etoxiquina, l'àcid ascòrbic, l'ascorbat de sodi i hidroquinones (com el TBHQ i el BHT), que s'addicionen en diferents passos dels anàlisis en els dissolvents, durant la saponificació, etc.

Un exemple de l'alteració de l'estructura per causa de l'oxigen, amb la llum com a catalitzador, és l'anomenat cicle de la violaxantina:

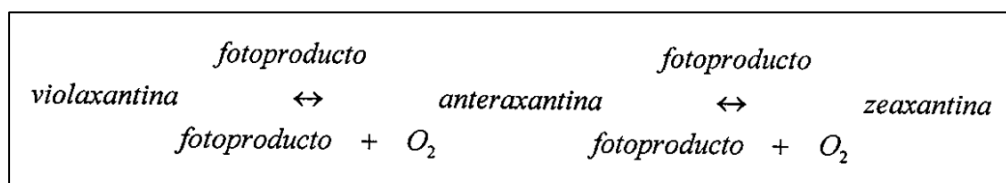


Figura 12. Cicle de la violaxantina

- ✓ Idealment, els carotenoides s'han d'emmagatzemar en forma cristal·lina, en la foscor i sota condicions de buit (Gross, 1987).
- ✓ Evitar el tractament amb dissolvent i absorbents àcids. La sílice gel no és recomanada per la seva acidesa inherent, que pot causar isomerització i degradació en els carotenoides.
- ✓ Per acció de la llum. És recomanable que el laboratori es trobi ben equipat amb làmpades perquè baixin la intensitat de la llum natural (Gross, 1987).

Les conseqüències més importants de la isomerització *cis* són:

- ✓ La intensitat del color decreix (Britton, Liaaen-Jensen, Pfander, 1995).

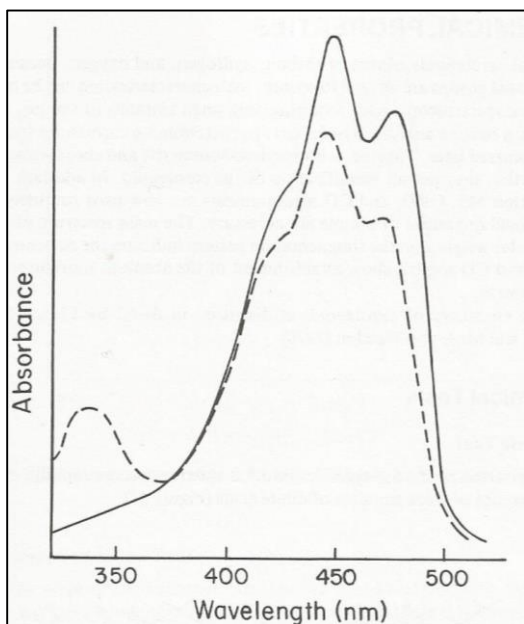


Figura 13. Comparació dels espectres d'absorció dels isòmers geomètrics del β -carotè (Gross, 1987)

- ✓ L'adsorció a la columna cromatogràfica varia notablement.
- ✓ Els màxims en l'espectre d'absorció es desplacen a longituds d'ona menors, de 2 a 5 nm (canvi hipsocròmic).
- ✓ Disminució de l'absorció (efecte hipocròmic)
- ✓ Apareix un nou màxim al voltant de 340 nm (Britton, Liaaen-Jensen, Pfander, 1995).

Sota l'acció dels factors enunciats, no només es produeix la isomerització dels carotenoides sinó també la seva destrucció.

2.4. Saponificació

La saponificació és necessària per eliminar les clorofil·les i el material greixos que pugui interferir en la cromatografia d'adsorció i hidrolitzar els èsters dels carotenoides, que disminuiran el resultat final de la quantificació dels carotenoides (Gross, 1987).

Per saponificar l'extracte es dissol en alcohol i després s'agrega KOH. L'extracte es pot deixar en repòs a la foscor o escalfar-se per accelerar la reacció. El mètode proposat per l'AOAC, s'extrau amb una mescla d'hexà:acetona:toluè:metanol 10:7:6:7 i s'addiciona KOH al 40% en metanol. És important saber que amb aquest mètode hi ha pèrdues del 100% degut a la presència de l'acetona que promou la isomerització. En conclusió, l'augment de la temperatura i de la concentració de KOH augmenten la descomposició de carotenoides, així com la presència d'acetona.

El mostreig, l'extracció i la saponificació es duen a terme fora del laboratori, gran part a la planta de producció de Constantí. La mostra ja venia etiquetada, emmagatzemada en una bossa fosca i empaquetada al buit. La meva tasca ha estat separar, identificar, quantificar, experimentar i extreure'n les respectives conclusions.

2.5. Separació

La cromatografia d'adsorció és la tècnica més important en l'aïllament dels carotenoides, que pot referir-se a cromatografia en columna flash, en capa fina i líquida d'alta resolució (HPLC) (Gross, 1987).

a. Cromatografia en columna

És el mètode clàssic per la determinació de carotenoides en aliments. Degut a la mida de partícula, les bandes es deformen i dificulten la separació, no s'utilitza alúmina com a adsorbent (Gross, 1987). La sílice gel és més recomanable per separacions preliminars, on els compostos difereixen molt en la seva polaritat.

Es segueix el procediment experimental explicat a l'apartat que hi ha a continuació. Cada fracció recol·lectada és evaporada (no és necessari, més endavant s'explica), redissolta en un petit volum de dissolvent i identificada per cromatografia en capa fina, espectrofotometria i tècniques similars (Gross, 1987). La separació dels carotenoides pot observar-se per la separació de bandes amb color. Els adsorbents solen variar la seva capacitat d'adsorció i la més petita quantitat d'impureses pot alterar el poder d'elució del dissolvent, per això, s'han d'assajar diferents proporcions de dissolvents cada vegada que s'utilitzi un lot nou d'adsorbent o que es tingui un analit diferent.

El gran avantatge que té la separació en columna flash és l'ús d'un equip simple i de baix cost.

b. Cromatografia líquida d'alta resolució

Els avantatges que presenten els mètodes d'HPLC són: rapidesa, simplicitat, reproductibilitat, exactitud, separació eficient, sensibilitat i menor exposició a l'oxigen, a la llum, adsorbent i dissolvent. Però el seu principal inconvenient és l'elevat cost de l'equip i els dissolvents utilitzats.

La major part dels mètodes utilitzen fase reversa per la quantificació, però en aquest treball s'utilitza una columna de fase normal. Els carotens són retinguts amb menor força i, per tant, eluiran al principi del cromatograma. Abans de col·locar la columna, es col·loca una precolumna, que conté el mateix material que la columna, però la mida de la partícula és major; s'utilitza per atrapar contaminants i per protegir la columna.

En les columnes s'utilitzen partícules de 3 a 10 µm, els avantatges són una elevada eficiència i un menor consum de dissolvent, però, presenten l'inconvenient de que disminueixen el temps de vida de la columna, a no ser que s'utilitzi una precolumna.

Les fases mòbils més comunes són combinacions d'acetonitril, cloroform, diclormetà, tetrahidrofurà, metanol i hexà utilitzats isocràticament. La fase mòbil és la variable que més es manipula, però els canvis no tenen efectes dramàtics en la resolució. En anàlisis de carotenoides es necessiten dissolvents orgànics de baixa viscositat, que solubilitzin carotenoides i que no sofreixin canvis amb la pressió. Totes aquestes consideracions limiten la selecció d'acetonitril i metanol.

La tècnica encara no està utilitzada àmpliament, degut a que l'equip i els dissolvents utilitzats tenen un alt cost i requereix una resolució òptima.

2.6. Identificació

Per establir la identitat dels carotenoides, una de les característiques més importants són els seus espectres d'absorció, que es troben en funció del cromòfor (part de la molècula que és responsable de l'absorció de llum) (Gross, 1987).

Quan es duu a terme la cromatografia, l'ordre d'elució també dona una idea de quin carotenoide pot ser, o almenys si es tracta d'un carotè o d'una xantofil·la.

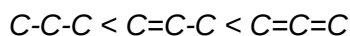
Recentment, l'espectroscòpia de masses, proporciona una idea més clara de l'estructura del carotenoide en qüestió. L'espectroscòpia infraroja s'utilitza per determinar la identitat dels grups funcionals presents (grups hidroxil, grups epòxids i grups carbonil). La ressonància magnètica nuclear de ^{13}C s'ha utilitzat també en ocasions per determinar les estructures (Gross, 1987).

Característiques d'adsorció dels carotenoides per cromatografia per columna:

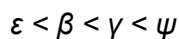
La força d'adsorció dels carotenoides està relacionada amb l'estructura química. És difícil fer una llista de les característiques d'adsorció dels carotenoides coneguts, però, es poden establir certes generalitats relacionant estructura i afinitat d'adsorció (Gross, 1987).

- ✓ En els carotens, l'adsorció està definida pel número de dobles enllaços, la naturalesa dels grups finals, i la mida de la molècula, mentre que les xantofil·les està definida per la naturalesa del grup oxigenat.

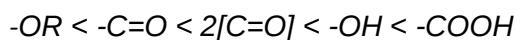
- ✓ Referent al tipus d'enllaç múltiples que estiguin presents en la molècula, s'ha aconseguit concloure que s'incrementa l'afinitat d'adsorció, segons el següent:



- ✓ El carotè simètric és millor adsorbit que un carotè asimètric amb igual número de dobles enllaços.
- ✓ Les estructures acícliques tenen major afinitat d'adsorció que les cícliques, així, el β -carotè elueix en una columna abans que el τ -carotè, i aquest abans que el licopè; l'orde en que augmenta l'afinitat d'adsorció és:



- ✓ El ε -carotè i el licopè, són els carotenoides insaturats més adsorbits.
- ✓ L'adsorció s'incrementa amb el llarg de la cadena: l'esqualè (C₃₀) és menys adsorbit que el licopersè (C₄₀).
- ✓ La presència de grups oxigenats augmenta l'afinitat d'adsorció del carotenoide de la següent forma:



- ✓ Els efectes dels substituents no són additius: una segona substitució té menys efecte que la primera.
- ✓ Els isòmers *cis* són més adsorbits que els *trans*.
- ✓ Si l'enllaç *cis* està al centre de l'estructura, és menys adsorbit que si es troba ens els extrems.

2.7. Quantificació

En cromatografia en columna la quantificació és relativament fàcil. Les fraccions recol·lectades (identificades) són quantificades espectrofotomètricament. L'absorbància, de les solucions de carotenoides de volum conegut, es llegeix a la

longitud d'ona de màxima absorció. La quantitat de carotenoides (en micrograms per gram de mostra) ve donada per l'expressió següent (Gross, 1987):

$$\text{Carotenoide } (\mu\text{g/g}) = \frac{\text{Absorbància} \cdot \text{volum (ml)} \cdot 10^6}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot 100 \cdot \text{pes (g)}}$$

Els coeficients d'absorció dels carotenoides es troben en solucions a l'1%, són l'absorbància d'una solució a l'1% (1 g en 100 ml de solució) en cel·les d'1 cm de pas de llum en la longitud d'ona apropiada (Gross, 1987).

3. OBJECTIU DEL TREBALL

La investigació en aquest camp freqüentment es dificulta degut a que les metodologies que s'utilitzen són llargues i costoses, i perquè els carotenoides són sensibles a la llum, la calor, l'oxigen i als àcids (a causa de l'alta conjugació de dobles enllaços presents en les seves molècules) (Gross, 1987). Degut a la importància biològica, és necessita un mètode ràpid i específic per quantificar els principals carotenoides presents en els aliments, que permeti obtenir resultats fiables i pugui ser utilitzat en estudis de biodisponibilitat.

Els mètodes escollits en aquest estudi, van ser l'oficial AOAC i el de l'empresa. L'oficial, basat en cromatografia en columna flash, va suposar partir de zero, buscar informació dels seus fonaments, conèixer habilitats i fer-ne un ús adequat. En el de l'empresa, en tenia un coneixement prèvi de dos mesos. El treball es va veure limitat per la disponibilitat dels materials del laboratori i el temps.

L'objectiu del present treball és la comparació de dos mètodes analítics per la determinació de xantofil·les totals en productes per a l'alimentació animal.

4. EXPERIMENTAL

4.1. Mètode oficial AOAC

A. Materials i Reactius

- a) **Extractant**, solució d'hexà-acetona-etanol-toluè (10+7+6+7)
- b) **Adsorbent I**, barrejar fins que la mescla sigui homogènia (durant 1-2 h), sílice gel i terra de diatomees en proporció (1+1) (p/p)
- c) **Adsorbent II**, barrejar fins que la mescla sigui homogènia (durant 1-2 h), òxid de magnesi (MgO) activat i terra de diatomees en proporció (1+1) (p/p)
- d) **Solució de sulfat de sodi al 10%**, dissoldre 100 g de sulfat de sodi anhidre en 1000 ml d'aigua.
- e) **Dissolvents d'elució:**
 - Per carotens**, solució d'hexà-acetona (96+4)
 - Per monohidròxi-pigments (MHP)**, solució d'hexà-acetona (90+10)
 - Per xantofil·les totals**, solució d'hexà-acetona-metanol (80+10+10)
- f) **2,6-diterbutil-4-metilfenol (BHT)**, 0.25 g BHT/500 ml dissolvents per MHP i xantofil·les totals (Megdal, Craft, Handelman, 2009)

B. Instrumentació

- a) **Columna cromatogràfica per carotens**, constituïda per una columna de vidre de 10 mm de diàmetre intern per 30 cm d'alçada, acabada en un tub capil·lar de 2 mm de diàmetre intern.
- b) **Columna cromatogràfica per xantofil·les**, constituïda per una columna de vidre de 10 mm de diàmetre intern per 20 cm d'alçada, sense tub capil·lar.
- c) **Equip de filtració al buit (pera Richardson)**, per a la recol·lecció de la elució en un matràs volumètric, el qual es fixa a la columna cromatogràfica per mitjà d'un tap de cautxú.
- d) **Espectrofotòmetre UV-Vis**, permet treballar amb una gran quantitat de longituds d'ona, també fa un escombrat en una regió de l'espectre donant un gràfic de l'espectre d'absorció de la substància. Aquest aparell consta d'un selector de λ , i una cubeta transparent d'1 cm de costat i 3 cm d'alt on es col·loca la solució a mesurar.

C. Preparació de la mostra

Les mostres es van preparar a partir del mètode que disposa l'empresa Novus però per raons de confidencialitat no es pot donar una descripció detallada del procediment de preparació de la mostra. S'extreuen els carotenoides de la matriu amb un dissolvent, es duu a terme una extracció líquid-líquid (dut a terme en el mètode AOAC), per tal de separar els components d'una barreja mitjançant la relació de les seves concentracions en dues fases immiscibles. En la fase aquosa s'hi troben part dels dissolvents més polars (acetona i etanol) i a l'orgànica part dels dissolvents més apolars (hexà i toluè) i els carotenoides.

La mostra es pot saponificar en fred o en calent, però no és necessari perquè ja està saponificada prèviament.

D. Procediment

a) Cromatografia

Introduir a la part inferior de la columna un trosset de cotó fluix i aplicar el buit per tal que quedi ben col·locat. Preparar una barreja de l'adsorbent I amb el dissolvent d'elució per carotens i la mescla resultant s'aboca a dins de la columna. Col·locar en l'aparell de filtració i aplicar el buit; arrossegat i afegir més adsorbent fins a obtenir una capa de 7 cm d'alçada (Morón, Zacarías, de Pablo, 1997); emprar el mateix dissolvent per compactar i anivellar la superfície de l'adsorbent. Col·locar una capa de 2 cm de sulfat de magnesi anhidre (MgSO_4) sobre l'adsorbent i compactar amb el mateix.

b) Carotens totals

Col·locar en un matràs volumètric de 10 ml sota la columna per recollir el dissolvent d'elució; amb una pipeta prendre 5 ml de la fase superior de la columna i aplicar el buit fins a aconseguir un flux de 2 a 3 gotes per segon, a una temperatura al voltant de 20°C. Amb l'ajuda d'una vàlvula de pas a la línia de buit controlar la quantitat de flux. Addicionar el dissolvent d'elució dels carotens, hexà-acetona (96+4), fins que tot el dissolvent penetri a l'adsorbent i continuar mentre la banda de carotens es recull dins del matràs. L'adsorbent s'ha de mantenir cobert amb la solució durant tot el temps, suspendre el buit i recollir la solució de carotens. Les xantofil·les queden retingudes a la columna.

c) Xantofil·les totals

Si es desitja conèixer el contingut de xantofil·les totals, s'agregarà amb una pipeta una alíquota de la fase superior de l'extracte original a la columna de 7 cm d'alçada de l'adsorbent II i s'extrauran els carotens amb el dissolvent d'elució dels monohidròxi-pigments, solució d'hexà-acetona (90+10) i les xantofil·les totals amb el dissolvent d'elució d'hexà-acetona-metanol (80+10+10). Emmagatzemar la solució a la fosc fins que arribi a la temperatura ambient, i diluir a volum amb el mateix dissolvent d'elució de xantofil·les. Invertir el matràs diverses vegades per barrejar i després determinar l'absorbància (Abs) immediatament.



Figura 14. Cromatografia en columna flash

E. Determinació de l'absorbància

Mesurar ràpidament l'absorbància (Abs) per tal de minimitzar la isomerització i les pèrdues per autooxidació. L'autooxidació és la combinació espontània de substàncies amb l'oxigen en l'aire a temperatura ambient (Gross, 1987). Tant en solució com en forma cristal·litzada, els carotenoides sofreixen autooxidació en presència d'oxigen, un procés de radicals lliures.

S'han de determinar les fraccions de carotens totals a una longitud d'ona de 436 nm i les fraccions de xantofil·les totals a 474 nm.

Cal tenir present les causes que poden provocar lectures errònies en l'espectrofotòmetre:

- ✓ Els compartiments de l'instrument han d'estar ben tancats per evitar l'entrada de llum difusa.
- ✓ Precisió en la col·locació de la cel·la.
- ✓ La pols dispersa la llum, que apareix en l'espectrofotòmetre com si fos absorbància.
- ✓ Les cubetes s'han de manipular amb un mocador de paper per evitar deixar les empremtes dels dits en les cares (les empremtes digitals dispersen i absorbeixen la llum), i s'han de mantenir molt netes.
- ✓ Solucions transparents sense partícules en suspensió.

F. Càlculs

La següent equació s'aplica per als valors d'absorbància obtinguts en l'espectrofotòmetre, els valors de 196 i 236 (absorbància específica) corresponen al *trans*-β-carotè i a la *trans*-luteïna per la longitud d'ona preestablerta:

$$XT \text{ (mg/g)} = \frac{Abs_{474} \cdot f}{A_{1cm}^{1\%} \cdot d \cdot b}$$

$$CT \text{ (mg/g)} = \frac{Abs_{436} \cdot f}{A_{1cm}^{1\%} \cdot d \cdot b}$$

$$d = \frac{pes \cdot V_1 \cdot V_2}{V_3 \cdot V_4 \cdot V_5}$$

CT = concentració de la fracció de carotens totals (mg/g)

XT = concentració de la fracció de xantofil·les totals (mg/g)

d = factor de dilució

pes = quantitat de mostra (g)

V₁ = volum pipetejat de la solució inicial (ml)

V₂ = volum d'extracte utilitzat en la columna (ml)

V₃ = volum del matràs aforat inicial (ml)

V₄ = volum de la fase superior de la mostra (ml)

V₅ = volum de la dilució final (ml)

b = longitud de la cel·la (cm) = 1

f = factor de correcció de l'equip = 1

A la **taula V** de l'Annex, es mostra el mètode oficial AOAC amb els diferents apartats: instrumentació, reactius, preparació, cromatografia, determinació i càlculs.

El mètode en columna flash és el que s'utilitza normalment per la determinació de carotenoides, aquest mètode permet aïllar suficient quantitat de cada un d'ells i llegir la seva absorbància en un espectrofotòmetre per determinar la seva concentració.

4.2. Mètode Novus

Aquest és un mètode de control de qualitat utilitzat per a la determinació del contingut de carotenoides totals i de xantofil·les. El contingut de xantofil·les dependrà de la riquesa de la matèria primera “*marigold oleoresin*”.

S'extreuen els carotenoides de la matriu amb un dissolvent, després es realitza una extracció líquid-líquid (dut a terme en el mètode AOAC), per tal de separar els components d'una barreja mitjançant la relació de les seves concentracions en dues fases immiscibles, i una posterior mesura de l'absorbància mitjançant un espectrofotòmetre UV-Visible. Per motius de confidencialitat no es pot explicar detalladament el mètode.

Es tracta d'un mètode més senzill i més ràpid que el mètode oficial. Els carotenoides estan menys exposats a la llum i s'evita el tractament amb àcids en columna.

A. Materials i Reactius

- a) **Extractant**, solució d'hexà-acetona-etanol-toluè (10+7+6+7)
- b) **Solució de sulfat de sodi al 10%**, dissoldre 100 g de sulfat de sodi anhidre en 1000 ml d'aigua.
- c) **Hexà grau HPLC**

B. Instrumentació

- a) **Espectrofotòmetre UV-Vis**
- b) **Cromatògraf líquid d'alta resolució (HPLC),**
 - ✓ Fase mòbil (hexà-acetat d'etil grau HPLC)
 - ✓ Bomba quaternària
 - ✓ Sistema d'injecció automàtic
 - ✓ Columna cromatogràfica en fase normal de sílice
 - ✓ Flux
 - ✓ Detector ultraviolat-visible de díodes en fila (UV-Vis DAD a 474 nm)
 - ✓ Sistema d'adquisició de dades

C. Preparació de les mostres

Es segueix el mateix procediment que l'apartat anterior (mètode AOAC).

D. Determinació de l'absorbància

S'han de determinar les fraccions de carotenoides a una longitud d'ona de 474 nm.

E. Càlculs

La següent equació s'aplica per als valors d'absorbància obtinguts en l'espectrofotòmetre, el valor de 236 (absorbància específica) corresponen a la *trans*-luteïna per la longitud d'ona preestablerta:

$$CT \text{ (mg/g)} = \frac{Abs_{474} \cdot f}{A_{1cm}^{1\%} \cdot d \cdot b}$$

$$d = \frac{pes \cdot V_1 \cdot V_2}{V_3 \cdot V_4 \cdot V_5}$$

$$XT \text{ (mg/g)} = \%XT(HPLC) \cdot CT$$

$$\%XT(HPLC) = 100 - \%carotens$$

CT = concentració de la fracció de carotenoides (mg/g)

XT = concentració de la fracció de xantofil·les totals (mg/g)

d = factor de dilució

pes = quantitat de mostra (g)

V₁ = volum pipetejat de la solució inicial (ml)

V₂ = volum d'extracte utilitzat en la columna (ml)

V₃ = volum del matràs aforat inicial (ml)

V₄ = volum de la fase superior de la mostra (ml)

V₅ = volum de la dilució final (ml)

b = longitud de la cel·la (cm) = 1

Per experiència prèvia, el senyal del β -carotè apareix aproximadament a $t_R=1.04$ min (0.27% en àrea). El pic de la *trans*-luteïna a temps de retenció $t_R=6.69$ i és el compost que presenta major àrea (91%), per tant, és el majoritari. Seguidament apareix el pic de la *trans*-zeaxantina a $t_R=7.69$ min amb una àrea del 5% i la zona dels isòmers *cis* (mirar la **taula VI** de l'Annex). Aquests compostos es van identificar mitjançant els espectres d'absorció comparant-los amb els espectres de la llibreria.

5. RESULTATS I DISCUSSIÓ

Per experiència prèvia, la identificació es realitza a partir dels espectres d'absorció. Es porta cada fracció extreta a un volum establert d'un dissolvent, s'obté el seu espectre i es llegeix la seva absorbància. Els carotenoides, generalment, presenten tres màxims d'absorbància. Aquests màxims s'han de comparar amb els valors donats en la literatura (Britton, Liaaen-Jensen, Pfander, 1995). Amb l'ajuda del programa "Scan" es van efectuar els espectres d'absorció en l'interval adequat (de 330 a 600 nm), per tal d'observar a quines longituds d'ona apareixien els màxims d'absorció.

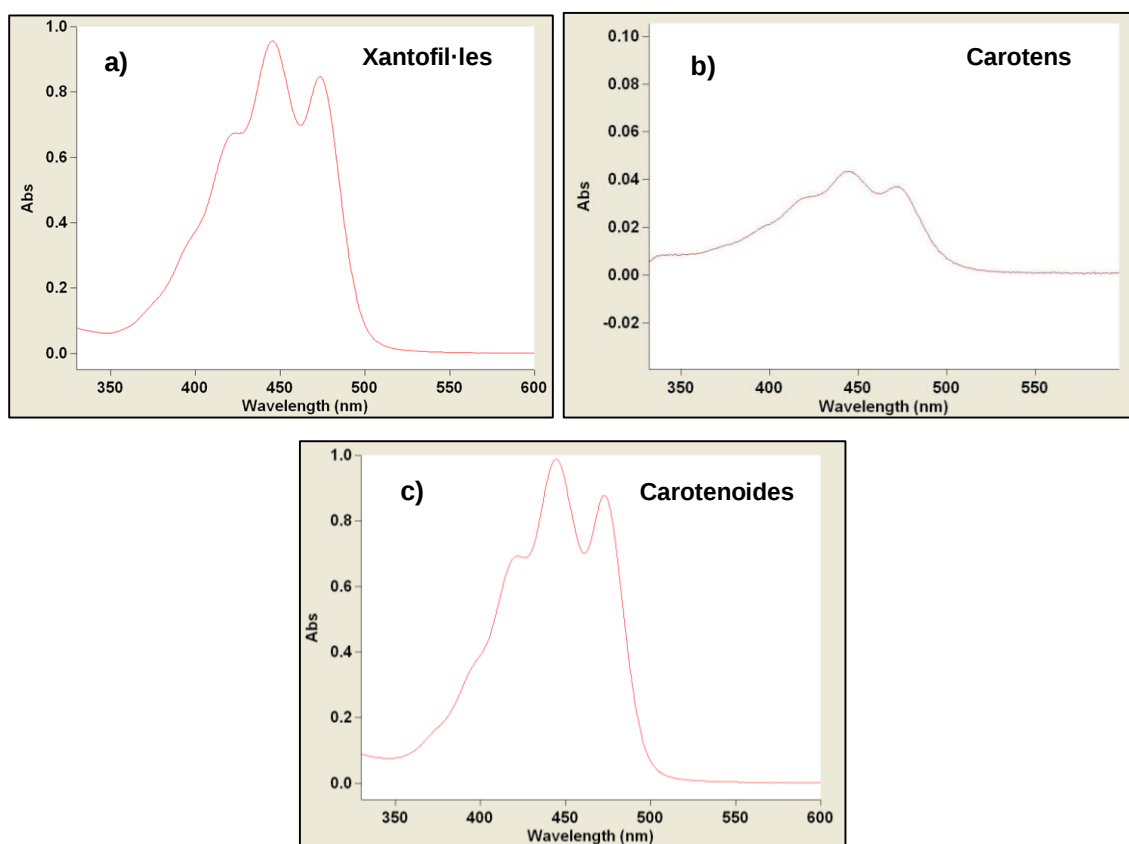


Figura 15. Espectres d'absorció utilitzant a) hexà-acetona-metanol (80+10+10), b) hexà-acetona (96+4) i c) hexà

Es pot observar que no apareix cap senyal interferent ni de dissolvent ni del seu complex amb la proteïna (normalment els carotenoides estan associats a lipoproteïnes, per tant, es troben lliures). Els senyals dels espectres d'absorció no es veuen distorsionats i es fa possible la seva identificació. Pel mètode oficial, les xantofil·les i els carotens es llegeixen a 474 nm i a 436 nm mitjançant el programa "Simple Reads" amb els mateixos dissolvents d'elució. Pel mètode Novus, els carotenoides es llegeixen a 474 nm amb hexà.

Segons les dades dels màxims d'absorció recopilades en la literatura, es van identificar cada una de les fraccions obtingudes per cromatografia en columna flash. Els màxims d'absorció de les bandes obtingudes van ser:

Taula 2. Màxims d'absorció dels analits d'interès.

Carotenoide	Solvent (literatura)	Solvent (mostra)	$\lambda_{\max}$ (literatura)			$\lambda_{\max}$ (mostra)		
β-carotè	hexà	hexà- acetona	436	450	477	(436)	450	477
trans-luteïna	hexà	hexà- acetona- metanol	422	445	474	(422)	445	474

Els valors que es troben entre parèntesi corresponen a pics mal definits, sobretot el cas del β -carotè. Aquests, es poden visualitzar a les figures anteriors.

5.1. Xantofil·les totals

La quantificació es realitza a partir del seu màxim d'absorbància. S'escull la longitud d'ona d'absorció màxima per dues raons:

1. La corba és relativament plana en el punt màxim, de manera que hi ha poca variació de l'absorbància si l'amplada de la banda seleccionada canvia lleugerament.
2. La sensibilitat més gran de l'anàlisi s'esdevé a l'absorbància màxima, és a dir, s'obté la resposta màxima d'una concentració d'analit analitzada.

En la taula següent s'observen els resultats de l'estudi comparatiu entre els dos mètodes i referits a la mostra en estudi.

Taula 3. Estudi comparatiu entre dos mètodes per a la determinació de xantofil·les totals.

Mostra (número)	Mètode Novus (mg/g)	Mètode AOAC (mg/g)
1	39.83	39.56
2	39.84	39.21
3	40.56	40.06
4	40.86	39.88
5	40.87	40.15
μ	40.39	39.77

Com es pot veure a la taula 2, s'obtenen majors valors de xantofil·les totals en el mètode Novus. Aquestes diferències entre els resultats podrien ser degudes a la isomerització i a l'autooxidació de les xantofil·les que es produeix al llarg de la separació a la columna. O, també, al no separar els carotens en el mètode Novus.

Es va procedir a injectar les fraccions a l'HPLC per tal d'observar si s'havien produït isòmers *cis* (augment de l'àrea dels pics isòmers *cis* del cromatograma). En el cromatograma es pot visualitzar que no se'n han produït. A la zona del β -carotè, apareix una banda més petita, pot fer pensar que han quedat restes de carotens. Per tant, es va fer l'espectre a $t_R=1.14$ min i es confirmà que es tracta de soroll de fons. Per tant, s'han eliminat correctament de la columna.

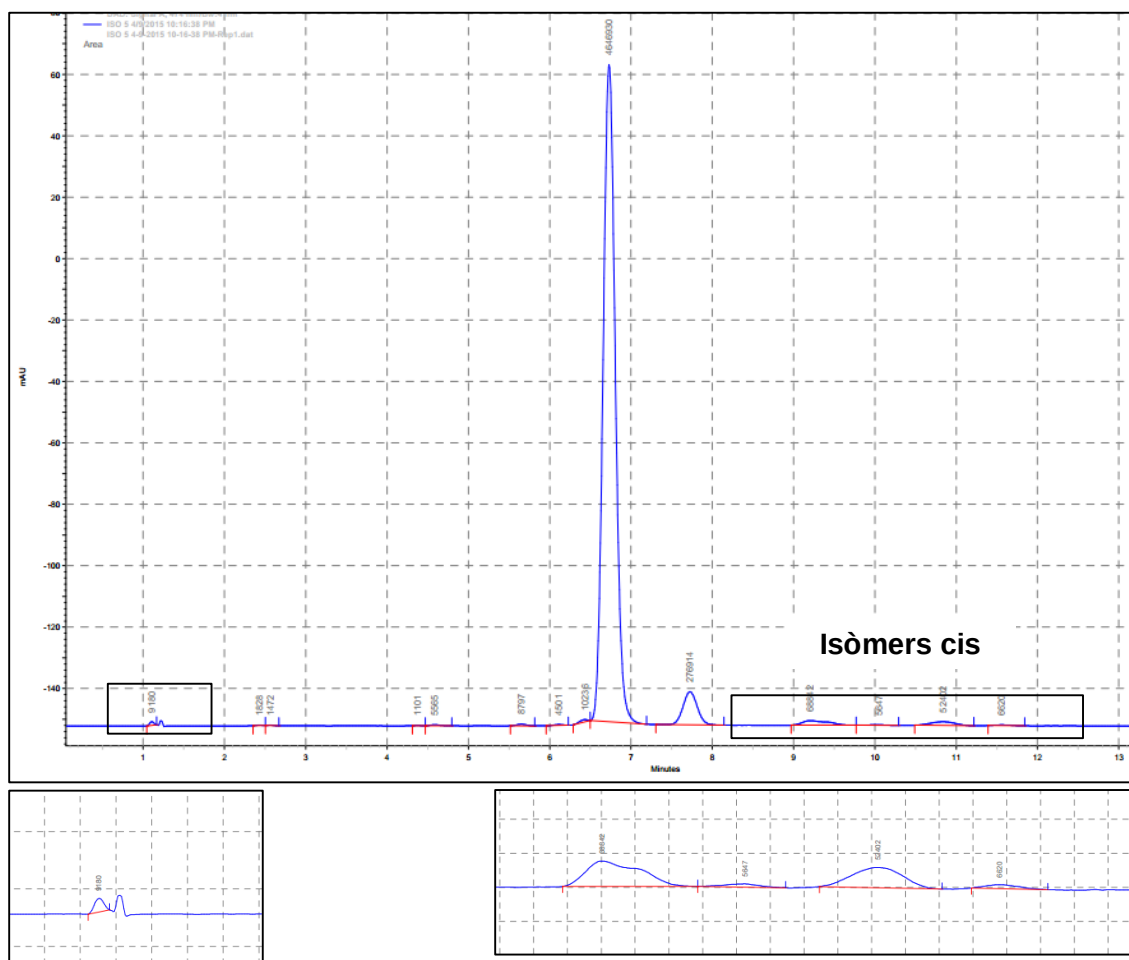


Figura 16. Cromatograma de les xantofil·les (AOAC)

En les fraccions recol·lectades hi ha presència de xantofil·les i dissolvent d'elució (hexà-acetona-metanol). Com que la fase mòbil del cromatògraf és una barreja d'hexà-acetat d'etil, els components d'interès de la mostra no es poden separar correctament degut a la incompatibilitat entre el solvent i la fase mòbil. Per tant, es va fer una extracció líquid-líquid amb la solució de sulfat de sodi al 10%. Així, part de l'acetona i del metanol es solubilitzen en la fase aquosa i les xantofil·les juntament amb l'hexà romanen a la fase orgànica. D'aquesta manera, s'han obtingut els cromatogrames sense la necessitat d'eliminar els dissolvents al rotavapor. Per tant, s'elimina el factor temperatura de l'anàlisi, ja que pot provocar isomerització cis dels carotenoides (mirar la **figura I** de l'Annex).

Per comparar dos valors mitjans, prèviament es tindrà que comprovar les dues variàncies amb un test F. Segons si les variàncies són comparables o no, s'aplicarà un test t o un altre.

Taula 4. Variàncies dels dos mètodes analítics per a la determinació de xantofil·les.

	Mètode Novus	Mètode AOAC
	39.83	39.56
	39.84	39.21
	40.56	40.06
	40.86	39.88
	40.87	40.15
Mitjanes	40.39	39.77
Desviacions estàndards	0.5229	0.3885
Variàncies	0.2734	0.1510

Abans de començar el càlcul estadístic, s'han d'eliminar aquells resultats que difereixen significativament de la resta (valors discrepants o *outliers*) mitjançant el test Q de Dixon.

Es consideren els cinc resultats de cada mètode, s'ordenen de manera ascendent i es calcula la Q_{cal} , que es defineix de la manera següent:

$$Q_{cal} = \frac{|valor sospitós - valor més pròxim|}{|valor més gran - valor més petit|} = \frac{|39.83 - 39.84|}{|40.87 - 39.83|} = 0.0123$$

$$Q_{tab (0.05,5)} = 0.710$$

Es repeteix el mateix procediment pels resultats de l'altre mètode:

$$Q_{cal} = \frac{|39.21 - 39.56|}{|40.15 - 39.21|} = 0.370$$

$$Q_{tab (0.05,5)} = 0.710$$

Com que $Q_{cal} < Q_{tab}$, no hi ha resultats sospitosos (*outliers*) i s'accepten amb un 95% de confiança (probabilitat que la nostra conclusió sigui correcta és superior al 95%) (veure la **taula III** de l'Annex).

El test F ens permet saber si dues desviacions estàndard són significativament diferents. Les variàncies dels dos mètodes es comparen mitjançant un test F:

$$F_{cal} = \frac{s_1^2}{s_2^2} = \frac{0.2734}{0.1510} = 1.81$$

El valor de F_{cal} es compara amb el valor F_{tab} (dues cues):

$$F_{tab}(\alpha, n_1-1, n_2-1) = F_{tab}(0.025, 4, 4) = 9.60$$

A la **taula II** de l'Annex, es mostren els valors a un nivell de confiança del 97.5%.

Com que $F_{cal} < F_{tab}$, s_1^2 i s_2^2 no difereixen estadísticament per un nivell de significació $\alpha = 0.025$. Com que no difereixen significativament, s'aplicarà la següent fórmula:

$$t_{cal} = \frac{|\mu_1 - \mu_2|}{\sqrt{s_p^2 \cdot \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}} = \frac{|40.39 - 39.77|}{\sqrt{0.212 \cdot \left(\frac{1}{5} + \frac{1}{5}\right)}} = 2.134$$

$$s_p^2 = \frac{(n_1 - 1) \cdot s_1^2 + (n_2 - 1) \cdot s_2^2}{n_1 + n_2 - 2} = \frac{4 \cdot 0.2734 + 4 \cdot 0.1510}{5 + 5 - 2} = 0.212$$

On s_p^2 és una desviació estàndard conjunta que s'ha calculat utilitzant els dos conjunts de dades.

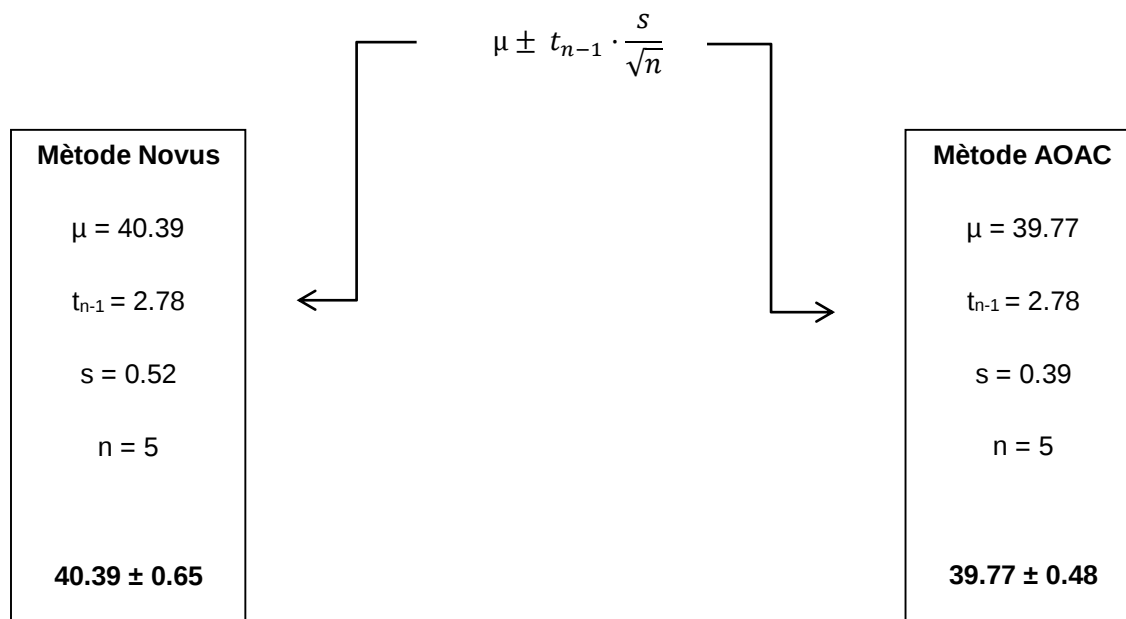
El valor t_{cal} es compara amb el valor t_{tab} (dues cues):

$$t_{tab}(\alpha, n_1 + n_2 - 2) = t_{tab}(0.05, 8) = 2.306$$

A la **taula IV** de l'Annex, es mostren els valors a un nivell de confiança del 95%.

Com que $t_{cal} < t_{tab}$, les dues mitjanes no difereixen estadísticament per un nivell de significació de $\alpha = 0.05$ i, per tant, les mitjanes dels dos mètodes són comparables.

A continuació, es calculen els intervals de confiança al 95% de les mesures de xantofil·les totals, aplicant la següent expressió:



5.2. Carotens totals

En la taula següent s'observen els resultats de l'estudi comparatiu entre els dos mètodes per la determinació de carotens. Es duen a terme cinc repeticions de la mateixa mostra, la qual ha de ser estable i homogènia.

Taula 5. Estudi comparatiu entre dos mètodes per la determinació de carotens totals.

Mostra (número)	Mètode Novus (mg/g)	Mètode AOAC (mg/g)
1	0.116	0.669
2	0.118	0.665
3	0.114	0.673
4	0.113	0.679
5	0.114	0.677
μ	0.115	0.673

Com es pot veure a la taula adjunta, s'obtenen valors més alts de carotens totals en el mètode AOAC que en el mètode Novus. Les magnituds dels valors dels resultats per un mètode i l'altre són diferents ja que el mètode Novus es tracta d'una aproximació.

Cal tenir present que es pot produir un error de lectura inherent en el detector espectrofotomètric. En la solució hi ha molt poca quantitat de carotens i, per tant, es llegirà molt poca absorbància. Això implica que casi tota la potencia incident travessi la dissolució i arribi al detector (és difícil distingir la diferència entre la mostra i la referència).

Durant la separació en la columna, l'anàlisi es va realitzar amb el menor temps possible ja que la sílice gel presenta acidesa i pot causar la degradació dels carotens. La llum també hi afecta, pot causar la seva descomposició.

Per comparar dos valors mitjans, prèviament es tindrà que comprovar les dues variàncies amb un test F. Segons si les variàncies són comparables o no, s'aplicarà un test t o un altre.

Taula 6. Variàncies dels dos mètodes analítics per a la determinació de carotens.

	Mètode Novus	Mètode AOAC
	0.116	0.669
	0.118	0.665
	0.114	0.673
	0.113	0.679
	0.114	0.677
Mitjanes	0.115	0.673
Desviacions estàndards	0.002	0.006
Variàncies	0.000004	0.000033

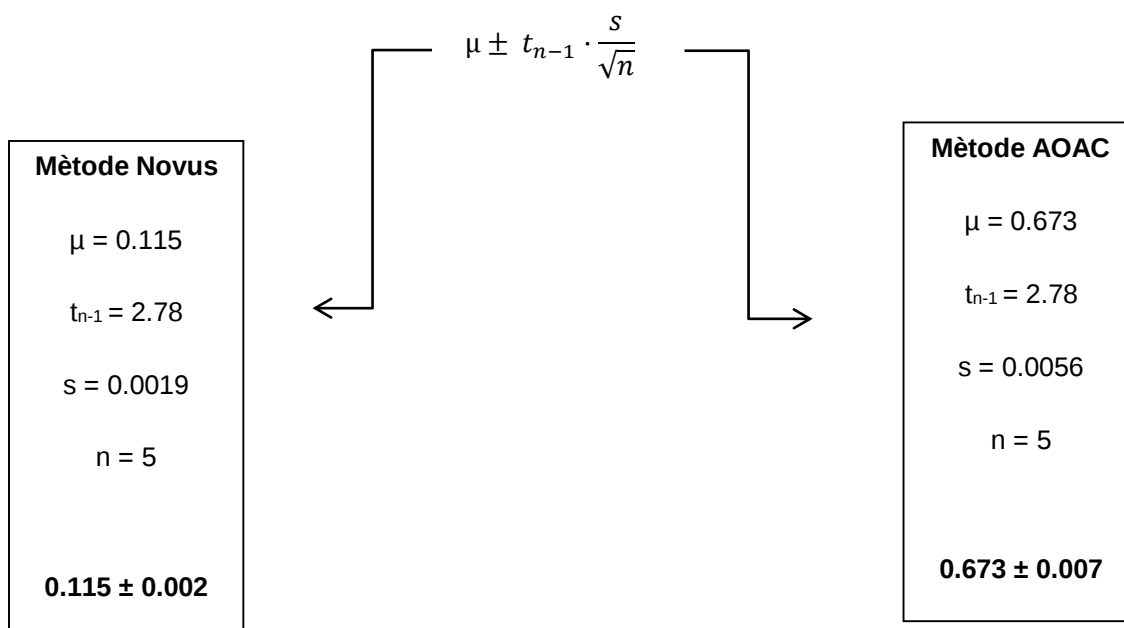
Es segueix el mateix procediment que l'apartat anterior.

Taula 7. Full de càlcul construït per a comparar les mitjanes dels valors dels dos mètodes utilitzats.

Test t: dues mostres que tenen variàncies iguals		
	<i>M. Novus</i>	<i>M. AOAC</i>
Mitjana	0,115	0,673
Variància	4E-06	3,28E-05
Observacions	5	5
Variància conjunta	0,0000184	
Dif. hip. entre les mitjanes	0	
Graus de llibertat	8	
t calculada	205,534087	
P(T<=t) una cua	1,7572E-16	
Valor crític de t (una cua)	1,85954804	
P(T<=t) dues cues	3,5144E-16	
Valor crític de t (dues cues)	2,30600414	

Com que $t_{cal} > t_{tab}$, les dues mitjanes difereixen estadísticament per un nivell de significació de $\alpha = 0.05$ i, com a conseqüència, les mitjanes no són comparables.

A continuació, es calculen els intervals de confiança al 95% de les mesures de carotens totals aplicant la següent expressió:



5.3. Estudi amb antioxidants

El mètode AOAC presenta més passos i manipulació de la mostra que el mètode Novus. Si s'addiciona un antioxidant (BHT) en els dissolvents d'elució s'assegura que no hi ha degradació de les xantofil·les durant la manipulació.

Es va procedir a addicionar 0.25 g BHT/500 ml dissolvents per MHP i xantofil·les totals segons el procediment descrit a la bibliografia (Megdal, Craft, Handelman, 2009).

En la taula següent s'observen els resultats de l'estudi comparatiu entre els dos mètodes per la determinació de xantofil·les. Es duen a terme cinc repeticions de la mateixa mostra.

Taula 8. Variàncies dels dos mètodes analítics per a la determinació de xantofil·les.

	Mètode Novus	Mètode AOAC
	41.27	41.22
	40.48	39.51
	40.69	40.18
	40.06	39.19
	40.35	39.65
Mitjanes	40.57	39.95
Desviacions estàndards	0.4547	0.7929
Variàncies	0.2067	0.6287

Abans de començar el càlcul estadístic, s'han d'eliminar aquells resultats que difereixen significativament de la resta (valors discrepants o *outliers*) mitjançant el test Q de Dixon.. (no hi ha resultats sospitosos).

Taula 9. Full de càlcul construït per a comparar les mitjanes dels valors dels dos mètodes utilitzats.

Test t: dues mostres que tenen variàncies iguals		
	<i>M. Novus</i>	<i>M. AOAC</i>
Mitjana	40,56865726	39,94877943
Variància	0,20672566	0,628735056
Observacions	5	5
Variància conjunta	0,417730358	
Dif. hip. entre les mitjanes	0	
Graus de llibertat	8	
t calculada	1,516449987	
P(T<=t) una cua	0,083938735	
Valor crític de t (una cua)	1,859548038	
P(T<=t) dues cues	0,16787747	
Valor crític de t (dues cues)	2,306004135	

Com que $t_{cal} < t_{tab}$, les dues mitjanes no difereixen estadísticament per un nivell de significació de $\alpha = 0.05$ i, com a conseqüència, les mitjanes són comparables.

Es va veure que hi ha resultats del mètode AOAC més alts i més baixos que el mètode Novus. Es creu que l'antioxidant té un temps de vida limitat en aquests dissolvents ja que s'extreu un major contingut de xantofil·les quan aquesta barreja porta poc temps preparada. D'aquesta manera, quan aquesta barreja porta un determinat temps preparada, el mètode AOAC no permet extreure un major contingut de xantofil·les que el mètode Novus. Aquesta part es va veure limitada pel temps i caldria fer més proves.

6. CONCLUSIONS

L'objectiu principal d'aquest treball era determinar el contingut de xantofil·les totals mitjançant la comparació de dos mètodes analítics. Ara que el treball està acabat, puc dir que el meu objectiu s'ha complert i, a més a més, n'he complert d'altres. Els resultats estadístics realitzats mostren que les diferències per a les xantofil·les totals no són significatives per un valor de $\alpha = 0.05$ i, per tant, les mitjanes són comparables.

La identificació de carotens i xantofil·les es van confirmar almenys en dues proves:

1. Ordre d'elució en la columna.
2. Espectres d'absorció comparats amb els espectres de la literatura (s'ha descartat la possibilitat de trobar pigments associats a proteïnes).

S'ha pogut observar, en alguns casos, que les fraccions en columna flash no tenen una separació adequada, el qual afecta considerablement a les bandes de carotenoides continguts en petites quantitats. Les seves bandes són difícils d'observar i, per tant, no es col·lecten o es col·lecten incompletes. Es pot concloure que la cromatografia en columna flash és més adient per a la quantificació dels carotenoides que es troben en major proporció.

Els pigments van ser estables a temperatura ambient, això és important ja que a temperatures elevades sofreixen isomerització *cis*. L'emmagatzematge en foscor és el factor més important a tenir en compte per mantenir l'estabilitat dels pigments. Es va observar que hi ha una certa relació no sempre constant entre la presència d'antioxidants amb el contingut de carotenoides, per tant, no podem determinar conclusions definitives en aquest sentit i s'haurien de portar a terme més proves.

El mètode basat en cromatografia en columna flash llegeix l'absorbància del β -carotè a 436 nm i de la *trans*-luteïna a 474 nm. Aquests dues longituds d'ona no corresponen a les bandes més intenses. Pel β -carotè i la *trans*-luteïna són 450 nm i 445 nm, respectivament. Per tant, la sensibilitat de l'anàlisi podria ser major si es mesurés a les absorbàncies amb major intensitat.

Podem concloure que l'estudi comparatiu entre els mètodes, demostra que el mètode Novus és el més adequat per a la determinació de xantofil·les. Dels dos mètodes utilitzats en l'anàlisi de carotenoides, l'oficial i el Novus, es considera el primer com el menys eficaç ja que requereix més temps d'anàlisi i els carotenoides estan més sotmesos als factors de la llum, l'oxigen i a la manipulació.

6. CONCLUSIONS

The main goal of this study was the comparison of two methods. We have found that there is not significant differences between AOAC method and Novus are ($\alpha=0.05$).

AOAC method requires more time, handling that could bring in more mistakes or variability. Novus method has been demonstrated as a better option for the determination of total xanthophylls.

7. BIBLIOGRAFIA/WEBGRAFIA

Llibres especialitzats

AMAYA, E., BECQUET, P., CARNÉ, S., PERIS, S. i MIRALLES, P. (2014). "Introduction". *Carotenoids in Animal Nutrition*. Brussels: Fefana, p. 5.

AMAYA, E., BECQUET, P., CARNÉ, S., PERIS, S. i MIRALLES, P. (2014). "NATURAL OCCURRENCE AND CLASSIFICATION". *Carotenoids in Animal Nutrition*. Brussels: Fefana, p. 6-17.

AMAYA, E., BECQUET, P., CARNÉ, S., PERIS, S. i MIRALLES, P. (2014). "ROLE OF CAROTENOIDS". *Carotenoids in Animal Nutrition*. Brussels: Fefana, p. 20-31.

BRITTON, G., LIAAEN-JENSEN, S. i PFANDER, H. (1995). "History: 175 Years of Carotenoid Chemistry". *Carotenoids. Volume 1A: Isolation Analysis*. Basel; Boston; Berlin: Birkhäuser, vol. 1, p. 1-11.

BRITTON, G., LIAAEN-JENSEN, S. i PFANDER, H. (2008). "Main List Natural carotenoids. Carotenoids with a C₄₀ skeleton. Hydrocarbons". *Carotenoids. Handbook*. Basel; Boston; Berlin: Birkhäuser.

BRITTON, G., LIAAEN-JENSEN, S. i PFANDER, H. (2008). "Main List Natural carotenoids. Carotenoids with a C₄₀ skeleton. Hydroxycarotenoids". *Carotenoids. Handbook*. Basel; Boston; Berlin: Birkhäuser.

BRITTON, G., LIAAEN-JENSEN, S. i PFANDER, H. (1995). "UV/Visible Spectroscopy". *Carotenoids. Volume 1B: Spectroscopy*. Basel; Boston; Berlin: Birkhäuser, vol. 1, p. 13-62.

FONT QUER, P. (1988). "DICOTILEDÓNEAS". *PLANTAS MEDICINALES. El Dioscórides renovado*. Barcelona: Editorial Labor, S. A., p. 97-515.

FONT QUER, P. (1988). "LAS ALGAS". *PLANTAS MEDICINALES. El Dioscórides renovado*. Barcelona: Editorial Labor, S. A., p. 3-5.

FONT QUER, P. (1988). "SIMPÉTALAS". *PLANTAS MEDICINALES. El Dioscórides renovado*. Barcelona: Editorial Labor, S. A., p. 517-873.

GROSS, J. (1987). "ANALYTICAL METHODS". *Pigments in Vegetables Chlorophylls and Carotenoids*. New York: Van Nostrand Reinhold, p. 99-111.

GROSS, J. (1987). "DEFINITONS AND NOMENCLATURE". *Pigments in Vegetables Chlorophylls and Carotenoids*. New York: Van Nostrand Reinhold, p. 76-77.

GROSS, J. (1987). "OXIDATION". *Pigments in Vegetables Chlorophylls and Carotenoids*. New York: Van Nostrand Reinhold, p. 92-98.

GROSS, J. (1987). "STEREOCHEMISTRY". *Pigments in Vegetables Chlorophylls and Carotenoids*. New York: Van Nostrand Reinhold, p. 86-89.

HARRIS, D.C. (2006). "ESTADÍSTICA". *ANÀLISI QUÍMICA QUANTITATIVA*. Barcelona: Editorial Reverté, S. A., p. 61-75.

MAYER, F. (1950). "GENERALIDADES. HIDROCARBUROS CAROTENOIDES. VITAMINA A". *LA QUÍMICA DE LAS MATERIAS COLORANTES NATURALES*. Nueva York: Aguilar, p. 3-38.

Recerca d'Internet

CENTENO MARTÍNEZ, C. (1972). *Composición cuantitativa de los carotenoides de la alfalfa fresca. Variación en función del ciclo de crecimiento y estado de desarrollo de la planta. Tesis. Madrid: Instituto de Alimentación y Productividad Animal (C.S.I.C).* <<http://polired.upm.es/index.php/pastos/article/viewFile/543/546>> [Consulta: 17 d'abril de 2015]

MEGDAL, P. A., CRAFT, N. A. HANDELMAN, G. F (2009). "A Simplified Method to Distinguish Farmed (*Salmo salar*) from Wild Salmon: Fatty Acid Ratios Versus Astaxanthin Chiral Isomers". Springer. *Lipids*. vol.44, p.569-576. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2697370/>> [Consulta: 18 d'abril de 2015]

MORÓN, C., ZACARÍAS, I. i DE PABLO, S. (1997). "Análisis de carotenoides" en Rodríguez Amaya, D. *PRODUCCIÓN Y MANEJO DE DATOS DE COMPOSICION QUÍMICA DE ALIMENTOS EN NUTRICIÓN*. Santiago (Chile): FAO. <<http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/AH833S00.htm#Contents>> [Consulta: 17 d'abril de 2015]

RAMOS BARRIOS, E. I. (1999). *Optimización y validación de un método para la determinación del perfil de carotenoides en frutas y vegetales por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)*. Tesis. Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. <http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_1947.pdf> [Consulta: 17 d'abril de 2015]

8. ANNEXOS

Taula I. Principals carotenoides trobats en els aliments

CAROTENOIDES	ESTRUCTURA
α -caroteno (Precursor de vitamina A)	
β -caroteno (Precursor de vitamina A)	
Licopeno	
α -criptoxantina (Precursor de vitamina A)	
β -criptoxantina (Precursor de vitamina A)	
Luteïna	
Zeaxantina	
Violaxantina	
Neoxantina	

Taula II. Valors crítics de F a un nivell de confiança del 97.5

The F-distribution
In the following table, values of the inverse cumulative frequency distribution of the F-distribution are given for several values of n_1 and n_2 , which are respectively, the number of degrees of freedom of the numerator and denominator. All values of the table correspond to a cumulative function equal to 0.975. This is equivalent to a two-sided table with α equal to 5%. (Reproduced with permission from D.L. Massart, A. Dijkstra and L. Kaufman, Evaluation and Optimization of Laboratory Methods and Analytical Procedures, Elsevier, Amsterdam, 1978.)

$n_2 \backslash n_1$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120	∞
1	647	779	864	899	922	937	948	956	963	968	976	985	993	997	1001	1005	1010	1014	1018
2	38.51	39.00	39.17	39.25	39.30	39.33	39.36	39.37	39.39	39.40	39.41	39.43	39.45	39.46	39.46	39.47	39.48	39.48	39.50
3	17.44	16.04	15.44	15.10	14.88	14.73	14.62	14.54	14.47	14.42	14.34	14.25	14.17	14.12	14.08	14.04	13.99	13.87	13.90
4	12.22	10.65	9.98	9.60	9.36	9.20	9.07	8.98	8.90	8.84	8.75	8.66	8.56	8.51	8.46	8.41	8.36	8.31	8.26
5	10.01	8.43	7.76	7.39	7.15	6.98	6.85	6.76	6.68	6.62	6.52	6.43	6.33	6.28	6.23	6.18	6.12	6.06	6.02
6	8.81	7.26	6.60	6.23	5.99	5.82	5.70	5.60	5.52	5.46	5.37	5.27	5.17	5.12	5.07	5.01	4.96	4.90	4.85
7	8.07	6.54	5.89	5.52	5.29	5.12	4.99	4.90	4.82	4.76	4.67	4.57	4.47	4.41	4.36	4.31	4.25	4.20	4.14
8	7.57	6.06	5.42	5.05	4.82	4.65	4.53	4.43	4.36	4.29	4.20	4.10	4.00	3.95	3.89	3.84	3.78	3.73	3.67
9	7.21	5.71	5.08	4.72	4.48	4.32	4.20	4.10	4.03	3.96	3.87	3.77	3.67	3.61	3.56	3.51	3.45	3.39	3.33
10	6.94	5.46	4.83	4.47	4.24	4.07	3.95	3.85	3.78	3.72	3.62	3.52	3.42	3.37	3.31	3.26	3.20	3.14	3.08
12	6.55	5.10	4.47	4.12	3.89	3.73	3.61	3.51	3.44	3.37	3.28	3.18	3.07	3.02	2.96	2.91	2.85	2.79	2.72
15	6.20	4.77	4.15	3.80	3.58	3.41	3.29	3.20	3.12	3.06	2.96	2.86	2.76	2.70	2.64	2.58	2.52	2.46	2.40
20	5.87	4.46	3.86	3.51	3.29	3.13	3.01	2.91	2.84	2.77	2.68	2.57	2.46	2.41	2.35	2.29	2.22	2.16	2.09
24	5.72	4.32	3.72	3.38	3.15	2.99	2.87	2.78	2.70	2.64	2.54	2.44	2.33	2.27	2.21	2.15	2.08	2.01	1.94
30	5.57	4.18	3.59	3.25	3.03	2.87	2.75	2.65	2.57	2.51	2.41	2.31	2.20	2.14	2.07	2.01	1.94	1.87	1.79
40	5.42	4.05	3.46	3.13	2.90	2.74	2.62	2.53	2.45	2.39	2.29	2.18	2.07	2.01	1.94	1.88	1.80	1.72	1.64
60	5.29	3.93	3.34	3.01	2.79	2.63	2.51	2.41	2.33	2.27	2.17	2.06	1.94	1.88	1.82	1.74	1.67	1.58	1.48
120	5.15	3.80	3.23	2.89	2.67	2.52	2.39	2.30	2.22	2.16	2.05	1.94	1.82	1.76	1.69	1.61	1.53	1.43	1.31
∞	5.02	3.69	3.12	2.79	2.57	2.41	2.29	2.19	2.11	2.05	1.94	1.83	1.71	1.64	1.57	1.48	1.39	1.27	1.00

Taula III. Valors de Q pel refús de dades

■ Test Q de Dixon

$$n = 3 \text{ a } 7$$

$$Q_{10} = \frac{x_2 - x_1}{x_n - x_1}$$

$$Q_{10} = \frac{x_n - x_{n-1}}{x_n - x_1}$$

$$n = 8 \text{ a } 12$$

$$Q_{11} = \frac{x_2 - x_1}{x_{n-1} - x_1}$$

$$Q_{11} = \frac{x_n - x_{n-1}}{x_n - x_2}$$

$$n \geq 13$$

$$Q_{22} = \frac{x_3 - x_1}{x_{n-2} - x_1}$$

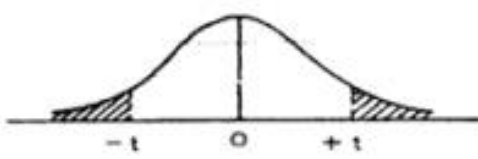
$$Q_{22} = \frac{x_n - x_{n-2}}{x_n - x_3}$$

2 cues

		$\alpha=0.05$	$\alpha=0.01$
Q_{10}	3	0.970	0.994
	4	0.829	0.926
	5	0.710	0.821
	6	0.628	0.740
	7	0.569	0.680
Q_{11}	8	0.608	0.717
	9	0.564	0.672
	10	0.530	0.635
	11	0.502	0.605
	12	0.479	0.579
Q_{22}	13	0.611	0.679
	14	0.586	0.670
	15	0.565	0.647

D.L. Massart et al. Handbook Of Chemometrics And Qualimetrics

Taula IV. Valors crítics de t a un nivell de confiança del 95%



In the table for the *t*-distribution, the rows correspond to the numbers of degrees of freedom (d.f.) and the columns to values of α . The table is two-sided, meaning that the probability for the variable to lie outside the interval $[-t, t]$ equals α . Note that for increasing d.f., the *t*-distribution converges to the standardized normal distribution. This can be seen by comparing the last row of the table (for d.f. = ∞) with the corresponding values of the normal distribution. (Reproduced with permission from D. Schwarz: *Méthodes Statistiques à l'Usage des Médecins et des Biologistes*, Flammarion, Paris, 1963, p. 287.)

d.f.	α								
	0.90	0.50	0.30	0.20	0.10	0.05	0.02	0.01	0.001
1	0.158	1.000	1.963	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657	636.619
2	0.142	0.816	1.586	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	31.598
3	0.137	0.765	1.250	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	12.924
4	0.134	0.741	1.190	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	8.610
5	0.132	0.727	1.156	1.476	2.015	2.571	3.365	4.222	6.869
6	0.131	0.718	1.134	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.959
7	0.130	0.711	1.119	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	5.408
8	0.130	0.706	1.108	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	5.041
9	0.129	0.703	1.100	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.781
10	0.129	0.700	1.093	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.587
11	0.129	0.697	1.088	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.437
12	0.128	0.695	1.083	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	4.318
13	0.128	0.694	1.079	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	4.221
14	0.128	0.692	1.076	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	4.140
15	0.128	0.691	1.074	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	4.073
16	0.128	0.690	1.071	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	4.015
17	0.128	0.689	1.069	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.965
18	0.127	0.688	1.067	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.922
19	0.127	0.688	1.066	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.883
20	0.127	0.687	1.064	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.850
21	0.127	0.686	1.063	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.819
22	0.127	0.686	1.061	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.792
23	0.127	0.685	1.060	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.767
24	0.127	0.685	1.059	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.745
25	0.127	0.684	1.058	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.725
26	0.127	0.684	1.058	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.707
27	0.127	0.684	1.057	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.690
28	0.127	0.683	1.056	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.674
29	0.127	0.683	1.055	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.659
30	0.127	0.683	1.055	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.646
∞	0.126	0.674	1.036	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	3.291

Taula V. Mètode oficial AOAC de carotens i xantofil·les en els vegetals i en les mesclures d'aliments. Mètode espectrofotomètric

45.1.04 AOAC Official Method 970.64 Carotenes and Xanthophylls in Dried Plant Materials and Mixed Feeds Spectrophotometric Method First Action 1970 Final Action 1974 A. Apparatus (a) <i>Chromatographic tube</i>.—12.5 mm id × 30 cm, Pyrex, with bottom capillary tube 2 mm id × ca 10 cm to extend into neck of 25 mL volumetric flask. (b) <i>Vacuum filtration device</i>.—For collection of eluate in volumetric flask (Fisher Scientific Co. "Filtrator," or equivalent). Attach rubber stopper to column to fit device. B. Reagents (a) <i>Acetone</i>.—Dry, alcohol-free. Distil over Zn (granular, ca 10 mesh). (b) <i>Hexane</i>.—Commercial; Phillips 66 Co. (Specialty Chemicals, PO Box 968, Borger, TX 79008-0968, USA), "high purity," or equivalent. (c) <i>Extractant</i>.—Hexane-acetone-absolute alcohol-toluene (10 + 7 + 6 + 7). (d) <i>Adsorbent I</i>.—Mix in mechanical blender 1–2 h 1 + 1 (w/v) silica gel G (according to Stahl; Brinkmann Instruments, Inc.) and diatomaceous earth (Hyflo Super-Cel). (e) <i>Adsorbent II</i>.—Mix in mechanical blender 1–2 h 1 + 1 (w/v) activated magnesia (Sea Sorb 43; Fisher Scientific Co.) and diatomaceous earth (Hyflo Super-Cel). (f) <i>Methanolic potassium hydroxide</i>.—40%. Dissolve 40 g KOH in methanol, cool, and dilute to 100 mL with methanol. (g) <i>Sodium sulfate solution</i>.—10%. Dissolve 10 g anhydrous Na₂SO₄ in 100 mL H₂O. (h) <i>Eluants</i>.—(1) <i>Carotenes</i>.—Hexane-acetone (96 + 4). (2) <i>Monohydroxy pigments (MHP)</i>.—Hexane-acetone (90 + 10). (3) <i>Dihydroxy pigments (DHP)</i>.—Hexane-acetone (80 + 20). (4) <i>Total xanthophylls (TX)</i>.—Hexane-acetone-methanol (80 + 10 + 10). (i) <i>1-(Phenylazo)-2-naphthol (C.I. Solvent Yellow 14; Sudan I) standard solutions</i>.—(1) <i>Stock solution</i>.—1.0 millimolar (mM). Recrystallize standard (Aldrich Chemical Co., No. 10,362-4) from hot absolute alcohol. Dry crystals to constant weight in 70°C vacuum oven. Dissolve 0.1241 g in 500 mL acetone-isopropanol (1 + 1). (2) <i>Working solution</i>.—0.04mM. Dilute 20 mL stock solution to 500 mL with acetone-isopropanol (1 + 1). Store in dark. C. Preparation of Test Portion Grind test sample to pass No. 40 sieve. Accurately weigh test portion (2 g corn gluten or alfalfa meal; 50 mg marigold meal; 4 g mixed feed) into 100 mL volumetric flask. Pipet 30 mL extractant into flask, stopper, and swirl 1 min. For low-moisture test portions, e.g., marigold meal, dehydrated alfalfa, or corn gluten (not air-dried samples), also pipet 1 mL H₂O/2 g test portion into flask, stopper, and swirl 1 min. For high-moisture (air-dried) test portions, omit addition of H₂O. (a) <i>Hot saponification</i>.—(For rapid extraction and for test portions containing xanthophyll esters.) Pipet 2 mL (4 mL for 4 g test portion of mixed feed) 40% methanolic KOH into flask, swirl 1 min, and place flask in 56°C water bath 20 min. Attach air condenser or cool neck of flask to prevent loss of solvent. Cool mixture, and let stand in dark 1 h. Pipet 30 mL hexane into flask, swirl 1 min, dilute to	volume with 10% Na₂SO₄ solution, and shake vigorously 1 min. Let stand in dark 1 h before chromatography. Upper phase is 50 mL. (b) <i>Cold (overnight) saponification</i>.—(For test portions not containing xanthophyll esters.) Pipet 2 mL 40% methanolic KOH into flask, mix, and let stand in dark ca 16 h. Proceed with hexane addition as in (a). D. Chromatography With column on Filtrator, place absorbent cotton or glass wool plug in bottom and add ca 12 cm layer Adsorbent I. Apply full vacuum and add more adsorbent to give 7 cm layer. Use flat instrument such as inverted cork on glass rod to press and flatten surface of adsorbent. Place 2 cm layer anhydrous Na₂SO₄ above adsorbent and press firmly. (a) <i>Total carotenes</i>.—With 25 mL volumetric flask as receiver, pipet 5 mL (or 10 mL if low pigment) of upper phase onto column and adjust vacuum for flow of 2 or 3 drops/s. Needle valve in vacuum line helps control flow rate. Add carotene eluant as last of solution enters adsorbent and continue until carotene band is collected in flask. Keep adsorbent covered with solvent at all times. Release vacuum, place carotene solution in dark until it reaches room temperature, and dilute to volume with carotene eluant. Invert flask several times to mix; then determine <i>A</i> immediately, as in E. Xanthophylls remain on column. For separation of monohydroxy from dihydroxy pigments (both free from epoxy and polyoxy pigments), or for total xanthophylls, proceed as in (b) or (c). (b) <i>Separation of xanthophylls</i>.—(1) With 25 mL volumetric flask in Filtrator and vacuum applied to column, let eluant level approach adsorbent surface; then immediately add MHP eluant. Band of monohydroxy pigments (zeinoxanthin, cryptoxanthin) and any persistent mono- or di-esters should move down column ahead of other bands. When elution of MHP band is complete, place flask in dark to attain room temperature before diluting to volume with MHP eluant and determining <i>A</i>. (2) Proceed as in (1), using DHP eluant to collect pigments of next band (lutein, zeaxanthin, and their isomers) in 25 (or 50) mL volumetric flask. Violaxanthin, neoxanthin, and other polyoxy pigments (POP) remain on column. (c) <i>Total xanthophylls</i>.—If value for total xanthophylls is desired, pipet fresh aliquot from upper phase of original extract onto 7 cm column of Adsorbent II, and elute carotenes with hexane-acetone (90 + 10) and total xanthophylls with hexane-acetone-methanol (80 + 10 + 10). E. Determination Measure <i>A</i> promptly to minimize isomerization and autooxidation losses. First, check calibration of spectrophotometer by reading working standard solution at 1 nm intervals between 469 and 479 nm. If maximum value is not at 474 nm, recalibrate instrument. When instrument shows maximum <i>A</i> at 474 nm and slit width is 0.03, working solution readings should be 0.561 (474) and 0.460 (436). Correct calculations from equations below, for instrument deviation factor. If instrument lacks controllable slit, estimate concentration by assuming that working standard solution of dye, B(1)(2), has same <i>A</i> as 2.35 mg carotenes/L at 436 nm and 2.38 mg xanthophylls/L at 474 nm. Determine <i>A</i> of carotene fraction at 436 nm and MHP and DHP fractions at 474 nm. For highest accuracy, control solution volumes to give <i>A</i> between 0.25 and 0.75. F. Calculations Following equations are applicable to <i>A</i> data obtained from calibrated spectrophotometers that operate with narrow slit width.
--	--

© 2005 AOAC INTERNATIONAL

Values 196 and 236 are a for *trans*- β -carotene and *trans*-lutein at prescribed wavelengths; b = cell length in cm; d = dilution factor = (g test portion $\times$ mL extract on column)/(50 mL upper phase $\times$ mL final dilution); and f = instrument deviation factor = 0.460/observed A_{436} or 0.561/observed A_{474} .

$$\text{Carotene fraction concentration (mg/lb)} = \frac{A_{436} \times 454 \times f}{196 \times b \times d}$$

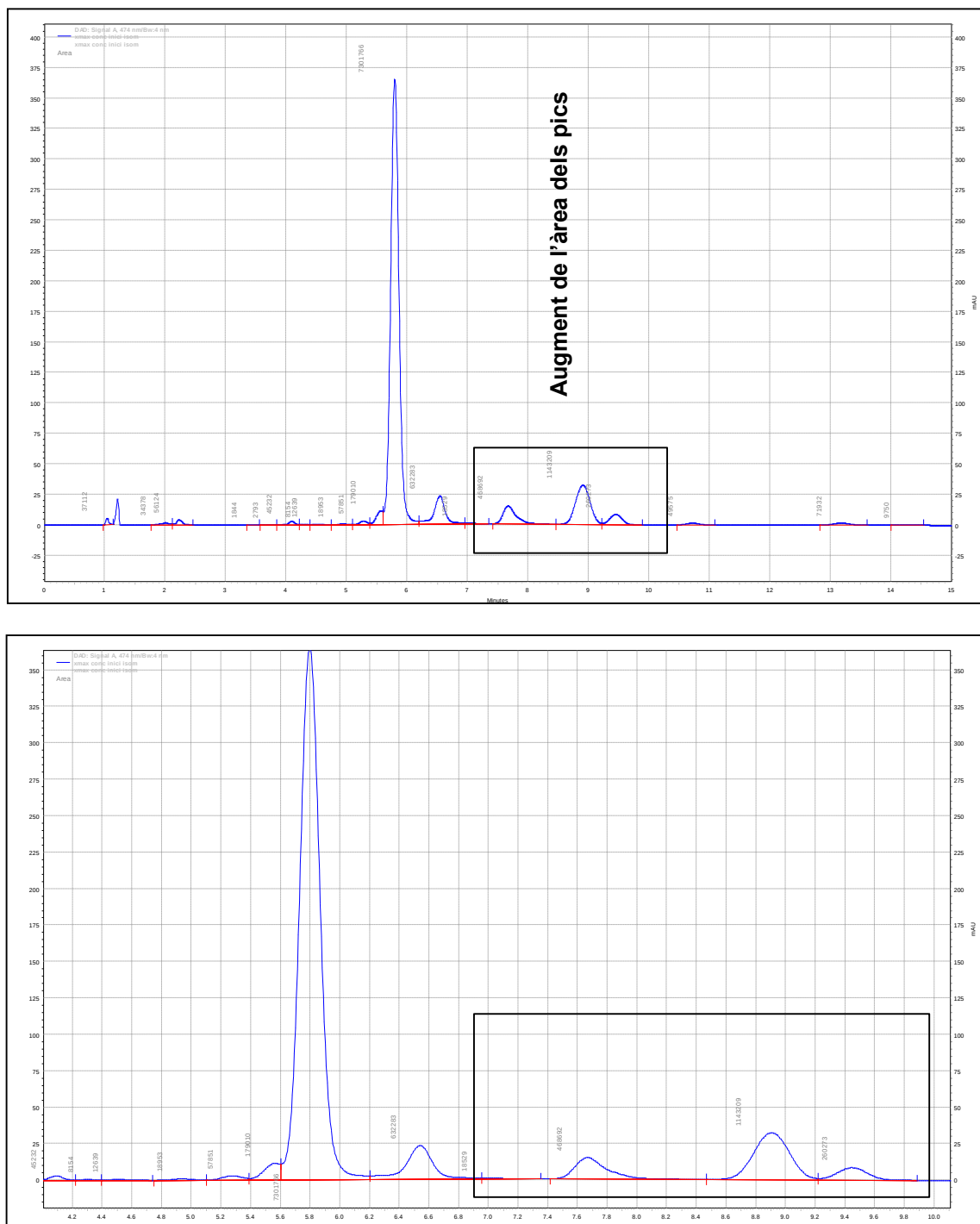
MHP fraction concentration (mg/lb), or DHP fraction concentration (mg/lb), or total xanthophylls (mg/lb) =

$$\frac{A_{474} \times 454 \times f}{236 \times b \times d}$$

References: *JAOAC* 37, 742(1954); 53, 181, 186(1970);
56, 748(1973); 57, 511(1974).

CAS-36-88-4 (carotene)
CAS-127-40-2 (xanthophyll)

Figura I. Cromatograma amb presència d'isòmers cis després d'eliminar el dissolvent d'elució en el rotavapor.



Taula VI. Valors de les àrees dels diferents components de la mostra

