

**OPTIMITZACIÓ DE LA TÈCNICA
PER A LA DETERMINACIÓ I QUANTIFICACIÓ
DE POLISACÀRIDS NO AMILACIS I
IMPLEMENTACIÓ EN UN NOU CROMATÒGRAF
DE GASOS.**

Sònia Gotsens Espina.

TREBALL DE FI DE GRAU DE QUÍMICA.

**Dirigit pel Sr. Josep Lluís Ramos Nadal, la Dra. Núria Tous Closa de
l'Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries
i la Dra. Maria Cinta Pujol Baiges de la Universitat Rovira i Virgili.**

Juny 2021.

ÍNDEX

1. RESUM.....	4
2. OBJECTIU	5
3. INTRODUCCIÓ.....	6
3.1. Polisacàrids no amilacis	6
3.2. Tipus de monosacàrids	6
3.3. Patró intern	7
3.4. Desenvolupament teòric	8
3.4.1. Etapa de desgreixatge	8
3.4.2. Etapa enzimàtica	8
3.4.3. Etapa de precipitació dels PNA solubles	8
3.4.4. Etapa de hidròlisi	8
3.4.5. Etapa de derivatització	9
4. PART EXPERIMENTAL.....	11
4.1. Optimització de la fitxa tècnica	12
4.1.1. Metodologia de la fitxa tècnica.....	13
4.1.2. Segona prova.....	13
4.1.3. Tercera prova.....	14
4.1.4. Quarta prova	14
4.1.5. Cinquena prova	14
4.1.6. Sisena prova	15
4.2. Posada a punt de l'equip	16
4.2.1. Metodologia de calibratge 1.....	16
4.2.2. Metodologia de calibratge 2	17
4.2.3. Metodologia de calibratge 3	17
4.2.4. Metodologia de calibratge 4	18
4.3. Condicions cromatogràfiques	18
5. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	20
5.1. Mostres	20
5.1.1. Mostres realitzades amb la metodologia de la fitxa tècnica.....	20
5.1.2. Mostres realitzades amb la segona prova	22
5.1.3. Mostres realitzades amb la tercera prova	25
5.1.4. Mostres realitzades amb la quarta prova	27
5.1.5. Mostres realitzades amb la cinquena prova	29

5.1.6. Mostres realitzades amb la sisena prova	31
5.2. Taula de calibratge	33
5.2.1. Preparació de patrons amb la metodologia de calibratge 1	33
5.2.2. Preparació de patrons amb la metodologia de calibratge 2	33
5.2.3. Preparació de patrons amb la metodologia de calibratge 3	34
5.2.3.1. Recta de calibratge de l'arabinosa	35
5.2.3.2. Recta de calibratge de la xilosa	36
5.2.3.3. Recta de calibratge de la manosa	36
5.2.3.4. Recta de calibratge de la galactosa	37
5.2.3.5. Recta de calibratge de la glucosa	37
5.2.4. Preparació dels patrons amb la metodologia de calibratge 4	38
6. CONCLUSIONS	40
7. BIBLIOGRAFIA	42
8. ANNEX	44

1. RESUM.

Català

Aquest treball de fi de grau té com a objectiu principal optimitzar la tècnica de la determinació i quantificació dels polisacàrids no amilacis, utilitzada en el laboratori de Nutrició Animal de l'IRTA, i alhora implementar-la en el nou cromatògraf de gasos.

Per tal de poder aconseguir aquests objectius, s'han dut a terme diferents proves en mostres diverses, com les de pinsos de porcs i pollastres. Per una banda, s'han aplicat certes modificacions a la tècnica per assolir una reducció de temps en la preparativa de les mostres i per d'altra banda, s'han realitzat diferents proves per implementar el mètode utilitzat en el cromatògraf de gasos, amb la corresponen taula de calibratge per quantificar les mostres. A més a més, s'ha intentat introduir la utilització de patró intern.

S'ha conclòs que els resultats obtinguts amb el mètode optimitzat són comparables als del mètode inicial. No obstant, serà necessari continuar estudiant altres mostres de diferents tipus per poder comprovar si aquest comportament es manté.

English

The aim of this Bachelor thesis is to optimize the technique of determination and quantification of non-starch polysaccharides used in the laboratory of IRTA-Animal Nutrition and at the same time to implement it in a new gas chromatograph.

To achieve these goals, several tests have been carried out in different feeds. On the one hand, certain modifications found in different bibliography have been applied to reduce time in the preparation of the samples and on the other hand, different tests have been performed to obtain the method used in the gas chromatograph, with the corresponding calibration table to quantify samples. In addition, an attempt to introduce the use of internal standard has been made.

The results obtained show that the optimized method provides similar results than the previous with a short time. However, it will be necessary to continue studying with different types of samples in order to see if the results obtained are the same.

2. OBJECTIU.

Aquest treball té tres objectius principals.

En primer lloc, té com objectiu principal l'optimització de la tècnica utilitzada per a la determinació dels polisacàrids no amilacis, del laboratori de Nutrició Animal de l'IRTA a fi de reduir el temps de la mateixa, ja que actualment el procediment dura 5 dies.

El segon objectiu és la incorporació d'un patró intern ja que en aquesta determinació fins ara no s'utilitzava.

I el tercer objectiu és la implantació del mètode en un nou cromatògraf de gasos amb detector de ionització de flama, implementant els paràmetres del mètode del cromatògraf anterior i creant una nova taula de calibratge.

3. INTRODUCCIÓ.

El treball de fi de grau ha estat realitzat al Laboratori de Nutrició Animal de l'IRTA - Mas Bové. En el laboratori es duen a terme tècniques per determinar-ne diferents paràmetres nutricionals com la matèria seca, la proteïna bruta, les cendres, els polisacàrids no amilacis (PNA) entre altres.

L'elecció del tema va anar lligat, d'una banda, en què la fitxa tècnica utilitzada en el laboratori per la determinació dels PNA es basa en els articles antics (H. N. Englyst & Cummings, 1988; Hans N. Englyst & Cummings, 1984)^{1,2} i el temps que s'ha de dedicar a la preparativa de la mostra és de cinc dies naturals, el que fa la tècnica una de les més laborioses i complexes del laboratori. Per d'altra banda, l'interès en vers a la cromatografia i per tant, en augmentar els coneixements en aquest àmbit.

3.1. Polisacàrids no amilacis.

Els PNA són polisacàrids que no presenten l'enllaç glicosídic α -1,4 característic del midó. Es poden trobar en diferents tipus de mostra com ara en les següents varietats de cereals: blat de moro, colza³, arròs⁴, civada, farina de blat, també pèsols⁵, pinsos⁴⁻⁷, i fins i tot, en fruites com són els plàtans⁸.

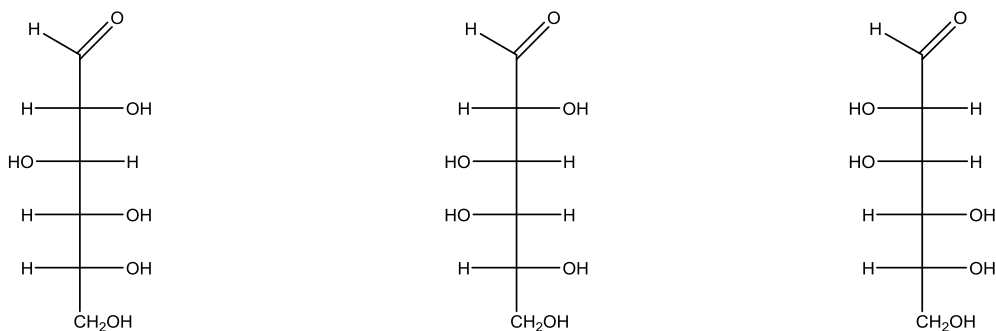
Els PNA formen part de la fibra i comprenen una gran varietat de molècules de polisacàrids⁹. La classificació d'aquests resulta complicada però, tot i així, es distingeixen tres grups principals: la cel·lulosa, els polímers no cel·lulòsics i els polímers pèctics.¹⁰

Els PNA impedeixen l'absorció dels nutrients incorporats en la dieta¹¹, de manera que per accedir-hi, els animals han de disposar d'enzims que degradin les parets cel·lulars dels cereals. Els animals monogàstrics, com les aus i porcs, no presenten enzims capaços de digerir els PNA¹² que es troben en els pinsos. És per això que les dietes d'aquests animals es suplementen amb enzims com la xilanasa. Per observar com actuen els enzims incorporats en els pinsos i valorar-ne la seva eficàcia, cal formular dietes riques en PNA. Com més alta sigui la concentració de PNA en el pinso, més activitat enzimàtica s'haurà d'incorporar a la dieta.

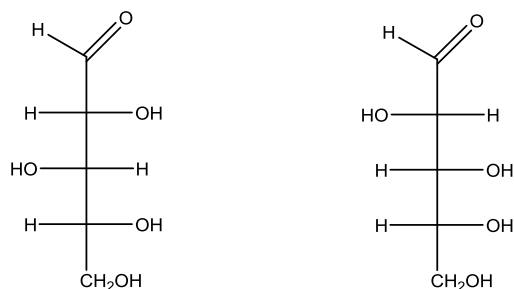
Per a poder determinar la quantitat de cada PNA, és necessari seguir el procediment de preparativa de mostra (Annex), en la qual s'acaben produint un seguit de reaccions per tal d'aconseguir els derivats adients que s'introdueixen al cromatògraf de gasos. D'aquesta manera, se'n quantifica els sucres, les estructures que formen els PNA. En aquest cas són: l'arabinosa, la galactosa, la glucosa, la manosa i la xilosa.

3.2. Tipus de monosacàrids.

Dins dels polisacàrids no amilacis hi ha un gran ventall de tipus que confereixen aquest grup¹⁰. En funció de la molècula de partença, les molècules obtingudes al final del procediment seran diferents. Per exemple, si en la mostra hi ha galactomanans, aquests es fraccionaran en molècules de D-galactosa i D-manosa. En el cas dels arabinoxilans, aquests donaran lloc a molècules de D-arabinosa i D-xilosa. La cel·lulosa es descomposarà en molècules de D-glucosa.



Imatge 1. D-glucosa, D-galactosa i D-manosa, respectivament realitzat amb ChemDraw 20.1.

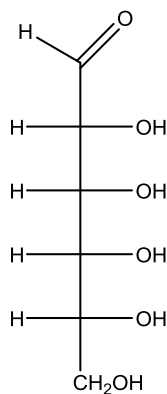


Imatge 2. D-xilosa i D-arabinosa, respectivament realitzat amb ChemDraw 20.1.

3.3. Patró intern.

En la utilització de cromatografia de gasos, es pot utilitzar el patró intern. Aquest compost, que actua com a patró intern, ha de ser similar a la mostra però no ha d'estar-hi present. La quantitat que s'introdueix d'aquest ha de ser coneguda. Perquè aquest compost actuï com a patró intern ha de complir diferents requeriments com són: que no interfereixi amb la mostra i que el pic cromatogràfic estigui ben diferenciat. Així doncs, es tracta d'un paràmetre analític que dona la seguretat que la realització de la tècnica sigui bona, ja que, encara que la precisió alhora d'introduir un volum no ho sigui, la relació entre l'analit i el patró intern no es veurà afectada.

En aquest cas, s'estudiarà l'introducció d'al·losa com a patró intern.



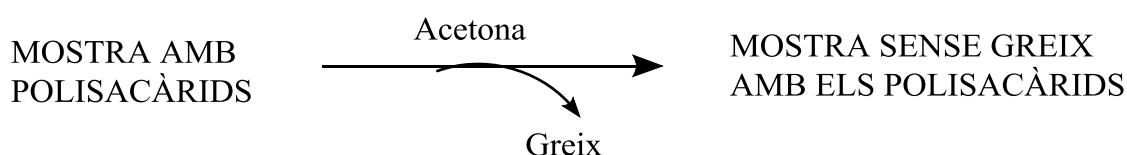
Imatge 3. Molècula de l'al·losa realitzada amb ChemDraw 20.1.

3.4. Desenvolupament teòric.

El procediment per determinar els PNA en mostres de pinso de porc i pollastre, utilitzat fins ara al laboratori de Nutrició Animal de l'IRTA, consta de diverses etapes que es produeixen en diferents dies.

3.4.1. Etapa de desgreixatge.

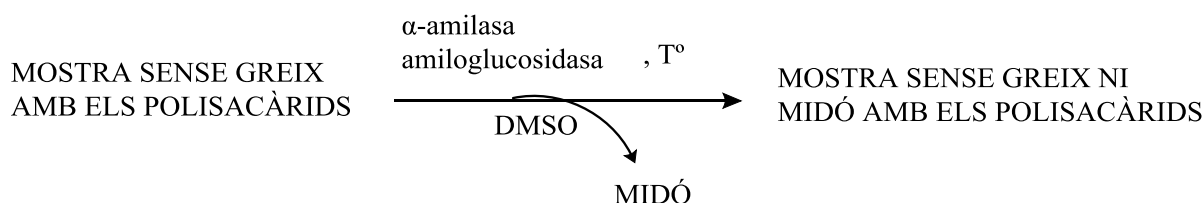
L'etapa per extreure el greix és la primera però no és obligatòria. Si la mostra conté entre un 90 - 100% de matèria seca i menys del 10% de greix, es pot obviar aquest pas.² En la fitxa tècnica es pot observar que s'aconsella que el % de greix sigui inferior al 4% si es vol ometre aquesta etapa. Afegint l'acetona, s'aconsegueix extreure aquest greix que contenen les mostres. A la Reacció 1 s'esquematitza aquest procés.



Reacció 1. Desgreixatge de la mostra amb acetona realitzat amb ChemDraw 20.1.

3.4.2. Etapa enzimàtica.

En segon lloc, es procedeix a realitzar l'etapa enzimàtica. La utilització del dimetilsulfòxid, DMSO, abans dels enzims ajuda a una extracció més senzilla del midó.¹³ A continuació, la introducció del tampó d'acetat sòdic, i dels enzims, l' α -amilasa i amiloglucosidasa juntament amb la seva incubació són els encarregats d'eliminar el midó de les mostres. A la Reacció 2 s'esquematitza aquest procés.



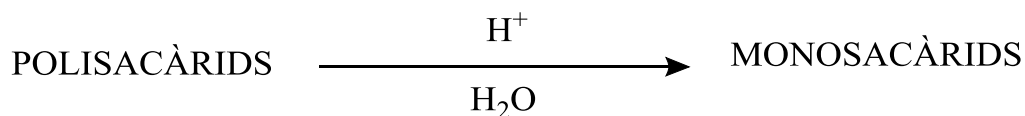
Reacció 2. Extracció del midó mitjançant enzims realitzat amb ChemDraw 20.1.

3.4.3. Etapa de precipitació dels PNA solubles.

Posteriorment, s'introdueix etanol pur per aconseguir que els PNA solubles precipitin.⁶ Es centrifuga i s'elimina el sobrenedant.

3.4.4. Etapa d'hidròlisi.

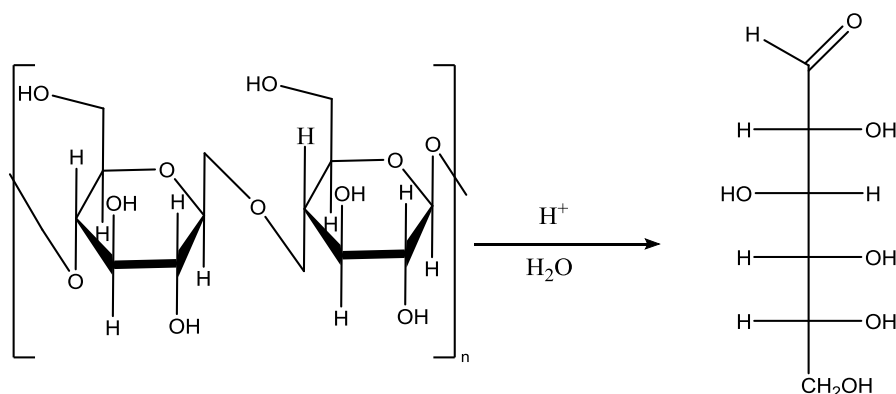
En aquest punt, els PNA es fraccionen en sucres. Per fer-ho, es realitza una reacció d'hidròlisi amb àcid sulfúric. La reacció s'esquematitza en la Reacció 3.



Reacció 3. Hidròlisi àcida dels polisacàrids realitzat amb ChemDraw 20.1.

Cal destacar que hi ha diferents polisacàrids no amilacis, i cada un d'ells donarà el corresponent monosacàrid. Tal i com s'ha comentat anteriorment en l'apartat 3.2.

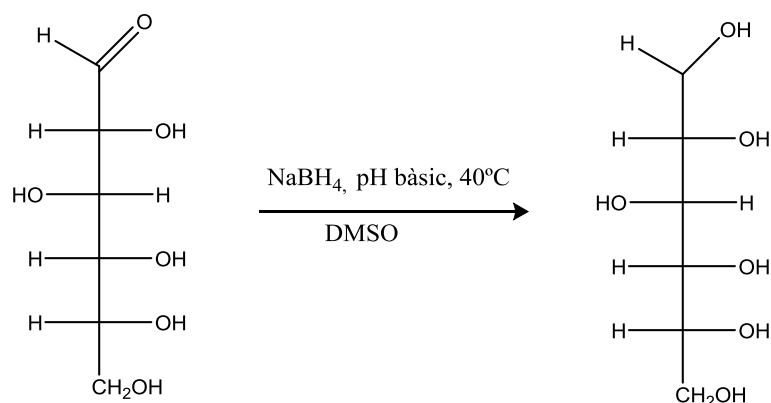
Per exemple, a partir de la cel·lulosa s'aconseguirà la glucosa com es pot veure en la Reacció 4:



Reacció 4. Hidròlisi de la cel·lulosa a glucosa realitzat amb ChemDraw 20.1.

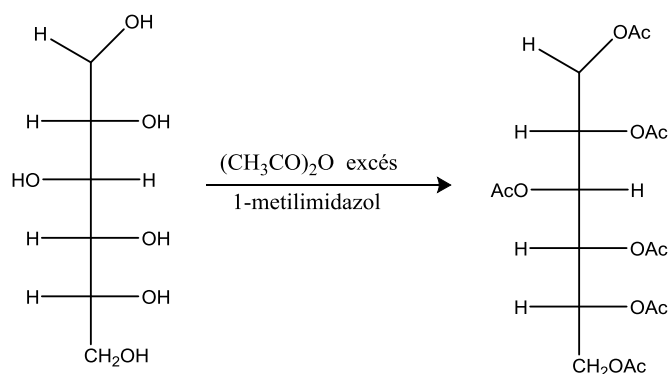
3.4.5. Etapa de derivatització.

Finalment s'arriba a l'última etapa, la qual modificarà els sucres obtinguts per tal d'aconseguir els derivats que interaccionaran millor amb la columna del cromatògraf de gasos. En aquest punt, s'introdueix un volum de solució d'amoníac 12M per tal d'aconseguir un pH bàsic. I a continuació, el NaBH_4 donant lloc a la reducció de l'aldehid a alcohol⁷ i així obtenir els alditols corresponents. Aquest procediment es pot observar en la Reacció 5.



Reacció 5. Reducció de l'aldehid a alcohol amb NaBH_4 realitzat amb ChemDraw 20.1.

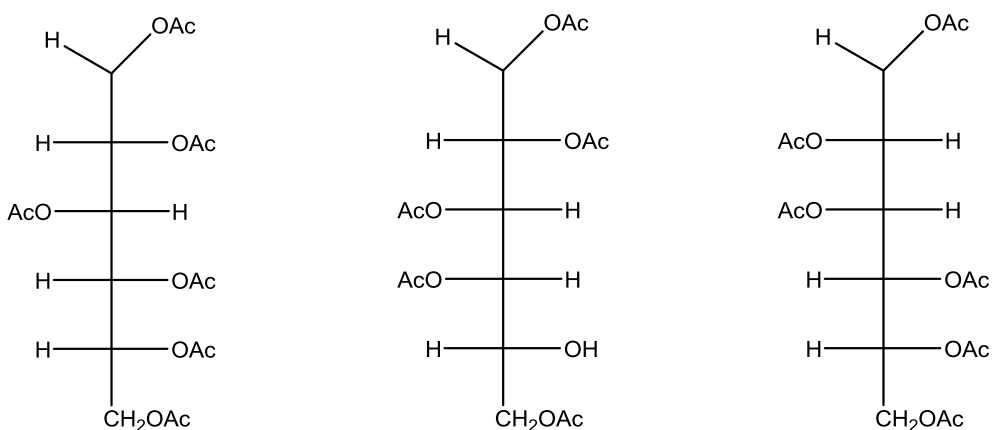
Tot seguit, es produeix la reacció d'acetilació dels grups -OH amb àcid acètic anhídrid i l'1-metilimidazol com a catalitzador com s'aprecia en la Reacció 6.



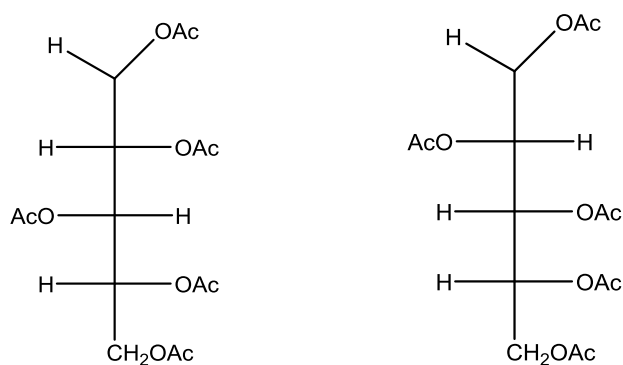
Reacció 6. Acetilació dels grups alcohol realitzat amb ChemDraw 20.1.

Per últim, amb la introducció de diclormetà s'aconsegueix separar la fase orgànica de la fase aquosa. La fase orgànica serà la d'interès i es trobarà en la part inferior ja que serà on és trobaran diluïts els sucres que s'analitzaran.

Les reaccions esmentades donaran lloc als cinc sucres que es determinaran tal i com s'indica en la Imatge 4 i 5.



Imatge 4. Molècules de glucosa, galactosa i manosa acetilades realitzades amb ChemDraw 20.1.



Imatge 5. Molècules de xilosa i arabinosa acetilades realitzades amb ChemDraw 20.1.

4. PART EXPERIMENTAL.

Per a realitzar la part experimental, en primer lloc es configura la llista de reactius que s'han utilitzat en la determinació i quantificació de les PNA. Es poden veure en la Taula 1. Per a la utilització i manipulació de tots els reactius s'ha fet servir la protecció adequada com ulleres de seguretat, bata, guants, campana extractora i mascareta FFP2. La mascareta amb filtres quan ha estat necessari.

Reactiu	Marca comercial	Toxicitat
Dimetilsulfòxid (DMSO)	Honeywell	No és perillosa però pot provocar-ne irritació ocular.
Etanol absolut	Panreac	És inflamable.
Etanol 96%	Panreac	És inflamable
Àcid sulfúric 98%	Honeywell	Pot provocar cremades
Amoníac 30%	Panreac	
Borohidru de sodi	Panreac	És inflamables, tòxic i perillós.
1-metilimidazol	Sigma Aldrich	Perillós i tòxic.
Àcid acètic glacial	Panreac	Perillós i pot provocar cremades.
Anhídrid acètic	Panreac	És inflamable i pot provocar-ne cremades.
Diclorometà	Honeywell	És tòxic i perillós
Glucosa	Sigma Aldrich	-
Arabinosa	Sigma Aldrich	-
Xilosa	Sigma Aldrich	-
Manosa	Sigma Aldrich	-
Galactosa	Sigma Aldrich	-
Al·losa	Sigma Aldrich	-
NaOH	Honeywell	Pot provocar cremades
Acetat sòdic	Panreac	Pot ser corrosiu
Clorur de calci	Panreac	Pot provocar irritació
α -amilasa termostable (3000 U/mL)	Megazyme	-
Amiloglucosidasa (200 U/mL)	Megazyme	-
H2O Milli-Q	Merck	-

Taula 1. Reactius utilitzats per realitzar el treball.

El procediment actual que s'utilitza en el laboratori per a la determinació i quantificació dels PNA i que s'ha seguit en algunes proves del treball, es pot trobar a l'annex.

A continuació, per una banda, es descriuen les diferents proves realitzades per tal d'intentar optimitzar la tècnica d'anàlisi de PNA i la seva posada a punt en un nou cromatògraf de gasos.

4.1. Optimització de la fitxa tècnica.

Primerament, es va cercar informació per millorar el mètode. Un dels articles trobats tenia una preparativa de mostra similar però presentava certes diferències. No obstant, es va decidir no posar-lo en pràctica ja que la matriu on s'analitzaven els PNA eren diferents varietats de plàtan⁸. Com què el tipus de mostra diferia molt, es va continuar cercant informació per tal de trobar un mètode més adequat per realitzar-se en pinsos.

Així doncs, es va escollir el mètode extret dels articles^{6,7}, el qual es determinaven els PNA en pinsos. L'objectiu, tal i com s'ha comentat anteriorment, és que el nou procediment redueixi el temps de preparació de la mostra un o dos dies.

Les mostres que s'han analitzat són pinsos destinats a dietes d'alimentació per a porcs i per a pollastres. La proporció dels compostos que els formen pot variar en funció de l'estudi que es realitzi. En aquest cas, estaven formades per ordi, blat, sègol, farina de soja, colza etc. Al presentar una gran varietat de components com ordi, blat, farina de soja, colza, etc, això fa que la matriu dels pinsos sigui força complexa.

Les mostres escollides per fer les diferents proves han estat les presents en la Taula 2:

Prova	Mostra 1	Mostra 2
Pinsos de porcs	Pinso A	Pinso B
Pinsos pollastres	Pinso C	Pinso D

Taula 2. Mostres escollides per realitzar les proves.

Es van analitzar dos pinsos de cada una de les espècies seleccionades per tal de veure'n la comparativa amb les modificacions que presentava el nou mètode. En aquests, s'han dut a terme els diferents assajos per duplicat per així poder-ne verificar el resultat i comprovar la repetibilitat. Cal destacar que de cada mostra per duplicat, s'acaben obtenint dos cromatogrames per assegurar-ne millor les dades obtingudes.

Cal ressaltar que les modificacions que s'han dut a terme en comparació amb el procediment que s'està realitzant al laboratori han estat:

- Realització de l'etapa de desgreixatge. S'intenta no dur a terme per observar-ne si hi ha canvis significatius.
- La introducció de DMSO o la seva omissió: es va seguir les pautes de certs articles^{6,7}, i en un primer moment, se'n va veure que hi havia certs passos que s'ometien, és a dir no es sabia si es duia a terme utilitzant-ho o no. D'aquesta manera, es va voler comprovar si era necessari el pas per si es podia ometre.
- El tampó d'acetat sòdic amb CaCl_2 : En aquests moments, s'utilitza un tampó exclusivament d'acetat sòdic, però en bibliografia consultada¹⁴ es podia observar que la introducció de CaCl_2 ajudava a l'estabilització i activació dels enzims que s'introdueixen a continuació.
- El volum d'enzims. S'ha introduït 100 μL tant en la utilització de l' α -amilasa com en l'amiloglucosidasa, ja què es va consultar en els articles llegits^{6,7}. D'aquesta manera, s'ha reduït a la meitat el volum d'aquests respecte fitxa tècnica.

- Temps i temperatura en la incubació de l'etapa enzimàtica. És l'etapa que se'n redueix més el temps ja que s'ha treballat introduint primer l' α -amilasa i incubant les mostres durant 1 hora a 100°C amb agitació, i a continuació, afegint l'amiloglucosidasa i incubant a 60°C durant 2 hores també amb agitació. Seguint la metodologia de la fitxa tècnica (Annex 1), el temps total d'incubació és en canvi de 18 hores.
- Ús del patró intern. Es realitza diferents proves per veure la viabilitat d'introduir el patró intern alhora de quantificar i al mateix temps, que ajudi en la identificació dels pics.

4.1.1 Metodologia de la fitxa tècnica.

En primer lloc, es va començar realitzant el procés segons la instrucció tècnica que s'utilitza al laboratori en aquests moments, per tal de conèixer i aprendre com es feia la tècnica i adquirir destresa en la preparativa de la mostra.

Així doncs, les dues mostres de pinsos de porc, es van preparar per duplicat. S'aconsegueixen 4 tubs amb la solució mare obtinguda després de realitzar la hidròlisi. D'aquests, se'n prenen dos al·lòtots en el moment d'agafar mostra per fer la derivatització i que posteriorment, s'introduirà al cromatògraf. D'aquesta manera s'aconsegueix 8 cromatogrames en total per aquestes dues mostres de pinso.

La fitxa tècnica informa que la pesada de mostra ha de ser aproximadament 200 mg. Els resultats de les pesades han estat els que es poden observar en la Taula 3.

Mostra	Pesada 1 (g)	Pesada 2 (g)
Pinso A	0,2031	0,2064
Pinso B	0,2194	0,2008

Taula 3. Pesades per realitzar la primera prova.

Es segueix la preparativa exacta de la fitxa tècnica, per tant, no s'introdueix patró intern.

4.1.2 Segona prova.

En segon lloc, es duu a terme el nou procediment amb les modificacions indicades a continuació:

La quantitat de mostra que s'introdueix ara és $250 \pm$ segons les recomanacions de l'article⁶. Les pesades de la segona prova han estat les que es poden apreciar en la Taula 4.

Mostra	Pesada 1 (g)	Pesada 2 (g)
Pinso A	0,2518	0,2518
Pinso B	0,2517	0,2532

Taula 4. Pesades per realitzar la segona prova.

En aquest cas, es prova de no realitzar l'etapa de desgreixatge per observar si és necessària o no.

En l'article esmentat anteriorment^{6,7}, hi havia reactius que no s'anomenaven. És per això que no es va introduir el DMSO a l'inici de l'etapa enzimàtica. Per tant, se'n podia verificar si ajudava a l'extracció del midó. A més a més, s'aplica la reducció del temps en l'etapa enzimàtica. S'introdueix l' α -amilasa i s'incuba a 100°C durant una hora i després, l'amiloglucosidasa, la qual s'incuba durant dos hores a 60°C.

A part, s'introdueix el patró intern, l'al·losa, la qual se'n pren un volum de 500 μ L d'una solució de 2000 ppm i s'introdueix en un dels duplicats.

4.1.3 Tercera prova.

En tercer lloc, es va voler continuar fent l'etapa de desgreixatge però ometent la introducció de DMSO. El temps i temperatura d'incubació es va realitzar de la mateixa manera a l'anterior prova.

Les pesades, en aquesta prova, han estat les de la Taula 5.

Mostra	Pesada 1 (g)	Pesada 2 (g)
Pinso A	0,2509	0,2520
Pinso B	0,2528	0,2534

Taula 5. Pesades per realitzar la tercera prova.

No obstant, en aquest cas, no es va introduir el patró intern, l'al·losa.

4.1.4 Quarta prova.

La següent prova va realitzar-se seguint la mateixa metodologia que la tercera prova. En aquest cas, però introduint el patró intern. D'aquesta manera, es podria veure la presència del sisè pic corresponent a l'al·losa.

Les pesades han estat les de la Taula 6.

Mostra	Pesada 1 (g)	Pesada 2 (g)
Pinso A	0,2527	0,2538
Pinso B	0,2518	0,2530

Taula 6. Pesades per realitzar la quarta prova.

4.1.5 Cinquena prova.

En aquesta prova, es va introduir DMSO abans de realitzar l'etapa enzimàtica, un dels paràmetres omesos en les anteriors proves.

Tanmateix, l'etapa enzimàtica es va continuar realitzant de la mateixa manera que en les proves anteriors. D'aquesta manera es podrà determinar l'efecte del DMSO.

En aquesta prova es va addicionar 500 µL de patró intern, provinent de la solució de 2ppm.

Les pesades han estat les següents que hi ha en la Taula 7.

Mostra	Pesada 1 (g)	Pesada 2 (g)
Pinso A	0,2535	0,2537
Pinso B	0,2521	0,2535

Taula 7. Pesades per realitzar la cinquena prova.

4.1.6. Sisena prova.

Finalment, es va realitzar el mètode amb les modificacions que s'havia fet servir en la cinquena prova però aplicant-se a les mostres de pinsos de pollastre. Per tant, es va aplicar la introducció de DMSO, la reducció de temps i augment de temperatura en l'etapa enzimàtica.

En aquestes mostres s'ha introduït patró intern de la solució de 2 ppm.

Les pesades que s'han realitzat de les mostres són les de la Taula 8.

Mostra	Pesada 1 (g)	Pesada 2 (g)
Pinso C	0,2521	0,2547
Pinso D	0,2520	0,2547

Taula 8. Pesades per realitzar la sisena prova.

4.2. Posada a punt de l'equip.

El cromatògraf de gasos en què s'han analitzat les mostres ha estat un GC-8890 de la marca Agilent i es pot veure en la Imatge 6 .



Imatge 6. Cromatògraf de gasos Agilent 8890.

Anteriorment a la posada a punt del nou equip, hi havia un altre equip, ja obsolet, el qual ja tenia configurat un mètode amb la seva pròpia taula de calibratge. S'ha volgut fer diverses proves per veure amb quines concentracions s'aconseguia una millor taula de calibratge per crear el mètode de punxada i quantificació.

4.2.1. Metodologia de calibratge 1.

En primer lloc, la preparativa dels patrons es va realitzar de la mateixa manera que la mostra. Per tant, una tanda de patrons es van dur a terme seguint la fitxa tècnica exceptuant l'etapa de desgreixatge. D'aquesta manera, es va realitzar l'etapa enzimàtica, la de precipitació dels NSP solubles, la hidròlisi i la derivatització.

Hi ha 4 patrons i cadascú d'ells té una massa més elevada d'un sucre. En aquest cas, com que s'ha seguit tots els passos de la fitxa tècnica, es treballa sense patró intern. Les pesades han estat les de la Taula 9.

Monosacàrid	Patró 1 (g)	Patró 2 (g)	Patró 3 (g)	Patró 4 (g)
Glucosa	0,0173	0,0320	0,0641	0,0925
Manosa	0,0626	0,0926	0,0139	0,0319
Arabinosa	0,0190	0,0334	0,0619	0,0953
Xilosa	0,0331	0,0629	0,0932	0,0133
Galactosa	0,0931	0,0153	0,0338	0,0626

Taula 9. Pesades per a fer els patrons de la taula de calibratge seguint la fitxa tècnica.

4.2.2. Metodologia de calibratge 2.

En aquesta prova, es van pesar les mostres i només es va realitzar l'etapa de derivatització per tal de formar els derivats més adequats per interaccionar amb la columna i introduir-los al cromatògraf de gasos.

Es tornen a realitzar 4 patrons que cadascú d'ells té una massa més elevada d'un dels sucre. Les pesades han estat les que es poden observar en la Taula 10.

Monosacàrid	Patró 1 (g)	Patró 2 (g)	Patró 3 (g)	Patró 4 (g)
Glucosa	0,0126	0,0314	0,0633	0,0938
Manosa	0,0323	0,0688	0,0961	0,0128
Arabinosa	0,0632	0,0954	0,0109	0,0314
Xilosa	0,1014	0,0114	0,0333	0,0720
Galactosa	0,0113	0,0303	0,0629	0,0913

Taula 10. Pesades per fer els patrons de la taula de calibratge amb patró intern amb l'etapa de derivatització.

A més a més, en aquesta prova, s'utilitza patró intern per tal d'observar que no interaccioni amb els altres analits i es pugui implementar posteriorment. En l'article llegit, es prepara una solució d'al·losa de 2ppm⁶. Es va consultar el volum que s'introduïa als autors del article ja que no s'especificava i és 500µL.

Per altra banda, es va seguir el mateix procediment però sense introduir el patró intern i les pesades van ser les de la Taula 11.

Monosacàrid	Patró 1 (g)	Patró 2 (g)	Patró 3 (g)	Patró 4 (g)
Glucosa	0,0149	0,0451	0,0644	0,0975
Manosa	0,0630	0,0937	0,0169	0,0324
Arabinosa	0,0172	0,0347	0,0617	0,0929
Xilosa	0,0338	0,0621	0,0923	0,0172
Galactosa	0,0965	0,0142	0,0346	0,0637

Taula 11. Pesades per fer els patrons de la taula de calibratge sense patró intern amb l'etapa de derivatització.

4.2.3. Metodologia de calibratge 3.

També es realitza una tercera prova tractant els patrons amb l'etapa d'hidròlisi i continuant amb la derivatització.

En aquest cas, es va treballar sense patró intern i les pesades van ser les següents de la Taula 12.

Monosacàrid	Patró 1 (g)	Patró 2 (g)	Patró 3 (g)	Patró 4 (g)
Glucosa	0,0132	0,320	0,0620	0,0929
Manosa	0,0646	0,0965	0,0139	0,0340
Arabinosa	0,0190	0,0317	0,0666	0,0930
Xilosa	0,0317	0,0699	0,0933	0,0163
Galactosa	0,0920	0,0137	0,0329	0,0614

Taula 12. Pesades per fer els patrons amb l'etapa d'hidròlisi i derivatització sense patró intern.

4.2.4. Metodologia de calibratge 4.

Mentre es feien les proves de calibratge, en especial la 2, es va observar que si es partia dels sucres i es procedia a fer la derivatització, com que el volum de reactiu era mínim, costava molt que es dissolguessin. En relació a aquest fet, es va voler provar d'aconseguir una taula de calibratge partint d'una solució mare de cadascun dels sucres, per tal que ja no hi hagués aquest problema.

Per aconseguir les solucions mare de cada sucre, és va pesar al voltant de 0,700 g de cada sucre i es va enrasar a un matràs de 10 mL.

Les pesades de cada sucre van ser les corresponents a la Taula 13.

Monosacàrid	Pes (g)
Glucosa	0,7004
Manosa	0,7039
Arabinosa	0,7038
Xilosa	0,7106
Galactosa	0,7023

Taula 13. Pesades per fer les solucions mare dels sucres.

Així doncs, les solucions mare tenien una concentració d'aproximadament 70.000 ppm. D'aquesta solució se'n va prendre els volums que indica la Taula 14 per preparar els 4 patrons per fer la recta de calibratge.

Monosacàrid	Patró 1 (µL)	Patró 2 (µL)	Patró 3 (µL)	Patró 4 (µL)
Glucosa	10	30	40	70
Manosa	50	90	10	20
Arabinosa	10	30	40	70
Xilosa	30	40	80	10
Galactosa	100	10	30	30

Taula 14. Volum per fer els patrons a partir de la solució mare, realitzats per l'etapa de derivatització i amb patró intern.

En aquest cas, es van preparar uns patrons amb patró intern i uns altres sense aquest. Per fer aquesta prova és va realitzar una solució mare de patró intern més concentrada, 16000 ppm. El volum que s'introduïa era 500µL.

4.3. Condicions cromatogràfiques.

Els patrons i les mostres es van introduir amb vials per tal de poder injectar-los al cromatògraf de gasos per mitjà del "Autosampler". El solvent en què s'ha eluït els compostos ha estat diclorometà.

Les condicions cromatogràfiques escollides han estat les següents:

- La columna utilitzada ha estat una Supelco ciano 90/10, (90% biscianopropil / 10% cianopropilfenil siloxà) amb dimensions 30m x 250µm x 0,2 µm. Una columna amb fase estacionària polar.

- L'injecció de la mostra s'ha fet mitjançant "Autosampler" i en mode Split. El volum d'injecció ha estat 1µL..
- La fase mòbil ha estat l'heli. La utilització d'aquest gas aporta diferents avantatges: ja que és inert, pur, no inflamable i és compatible amb la majoria dels detectors i els analits.
- El flux ha estat determinat a 0,8 mL/min.
- El detector de l'equip ha estat un detector de ionització de flama (FID).
- L'ordre d'elució dels compostos ha estat arabinosa, xilosa, manosa, galactosa i glucosa. El temps de retenció de l'arabinosa i la xilosa és menor com a conseqüència de la seva estructura, la qual presenta cinc carbonis, mentre que la resta dels sucres són hexoses i al tenir un carboni més hi haurà més interaccions que faran que el temps de retenció sigui major.

El programa determinat per a la quantificació dels PNA ha correspost al mostrat en la Taula 15.

	Temperatura (°C)	Temps (min)	Temps total d'anàlisi
Condicions	235	30	30

Taula 15. Condicions de temperatura i temps del mètode utilitzat per PNA en el GC.

Així doncs, com es pot apreciar el rang de temperatura establerta per aconseguir els cromatogrames ha estat isoterm. Per tant, s'ha mantingut fixa la temperatura de la columna a 235°C.

5. RESULTATS I DISCUSSIÓ.

A continuació es presenten els resultats que s'han obtingut al llarg de tot el procediment que s'ha exposat i la seva discussió.

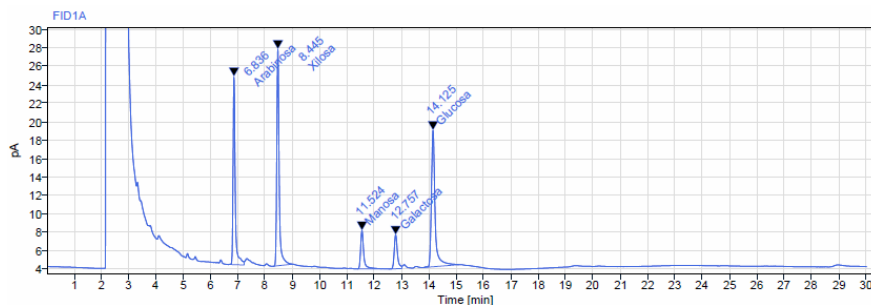
5.1. Mostres.

Els valors dels monosacàrids s'expressen en % d'àrea. La suma dels cinc pics és el 100%.

5.1.1. Mostres realitzades amb la metodologia de la fitxa tècnica.

En la primera prova es va seguir la fitxa tècnica del laboratori (Annex 1). Hi havia dos pinsos de porcs, pinso A i B. De cada mostra se'n fa un duplicat i per dur a terme la derivatització, es torna a prendre dos alíquotes per tenir més informació en els cromatogrames.

Com es pot veure en la Imatge 7, el cromatograma obtingut per la mostra de pinso A ha estat el següent que es pot observar en la Imatge 7:



Imatge 7. Cromatograma del pinso A realitzat seguint la fitxa tècnica del laboratori.

Tal i com és d'esperar, s'observen els cinc pics corresponents als diferents sucres que es quantifiquen: l'arabinosa, la xilosa, la manosa, la galactosa i glucosa.

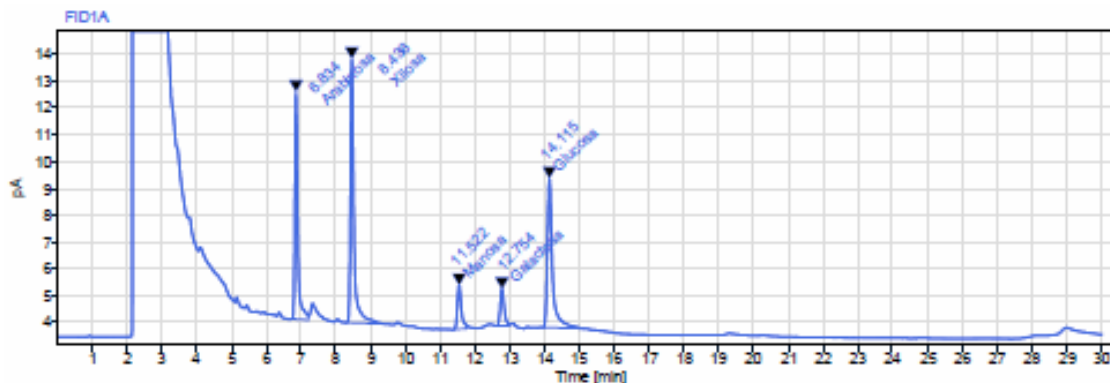
En la mostra A, un duplicat no es va introduir en el cromatògraf perquè una vegada la mostra estava al vial, aquest no es va tancar bé i la mostra es va evaporar. És per això que, enlloc de quatre cromatogrames amb els respectius resultats, n'hi ha tres.

Monosacàrids	t _r (min)	1r resultat		2n resultat		3r resultat	
		Àrea	% Àrea	Àrea	% Àrea	Àrea	% Àrea
Arabinosa	6,836	112,78	24,58	25,62	25,21	51,86	26,75
Xilosa	8,445	142,82	31,12	33,55	33,01	62,63	32,31
Manosa	11,524	32,86	7,16	8,54	8,40	13,23	6,83
Galactosa	12,757	30,13	6,57	5,81	5,72	12,04	6,21
Glucosa	14,125	140,30	30,57	28,11	27,66	54,08	27,90
Total			100		100		100

Taula 16. Resultats de la primera i segona pesada de la mostra A en la primera prova.

En la taula 16 s'aprecia que el % d'àrea entre els diferents cromatogrames és molt similar, és a dir, la relació de cada monosacàrid acaba sent del mateix ordre encara que l'àrea dels pics disti una mica entre ells. Això, pot ser degut a pèrdua de mostra durant el procediment, a un error en el pipeteig alhora d'agafar l'alíquota per realitzar la derivatització, etc. A part, els compostos surten als mateixos temps de retenció.

A continuació, en l'Imatge 8 es presenten els resultats del pinso B:



Imatge 8. Cromatograma del pinso B realitzat seguint la fitxa tècnica del laboratori.

El cromatograma obtingut del pinso B, Imatge 8, és similar a l'anterior i també apareixen els cinc pics d'interès. Els resultats d'àrea i % d'àrea es presenten en la Taula 17 i 18:

Monosacàrids	t _r (min)	1r resultat		2n resultat	
		Àrea	% Àrea	Àrea	% Àrea
Arabinosa	6,834	49,64	24,97	94,14	23,68
Xilosa	8,438	68,33	34,37	135,88	34,18
Manosa	11,522	13,03	6,55	27,03	6,80
Galactosa	12,754	10,90	5,48	25,42	6,39
Glucosa	14,115	56,90	28,62	115,09	28,95
Total			100		100

Taula 17. Resultats de la primera pesada de la mostra B per la primera prova.

Monosacàrids	t _r (min)	1r resultat		2n resultat	
		Àrea	% Àrea	Àrea	% Àrea
Arabinosa	6,834	32,07	25,04	87,95	24,66
Xilosa	8,438	40,72	31,79	113,62	31,85
Manosa	11,522	10,43	8,14	29,65	8,31
Galactosa	12,754	7,36	5,75	23,49	6,59
Glucosa	14,115	37,50	29,28	102,00	28,59
Total			100		100

Taula 18. Resultats de la segona pesada B per la primera prova.

Comparant els resultats de la Taula 16 amb les Taules 17 i 18 que s'han aconseguit, es pot veure que l'àrea dels pics fluctua bastant però tot i així, la relació respecte el % àrea entre els cinc pics en total és molt similar en els quatre cromatogrames.

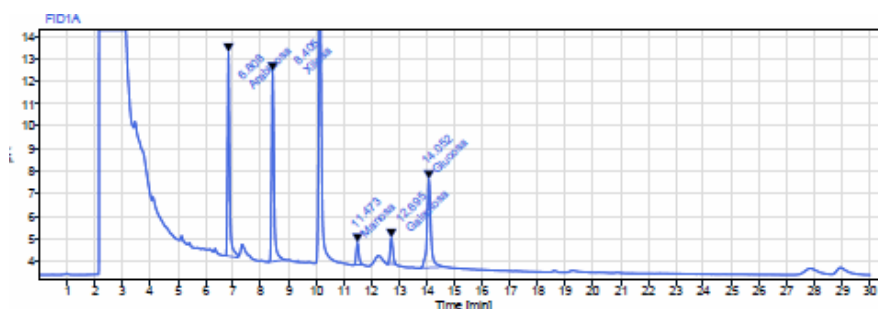
5.1.2. Mostres realitzades amb la segona prova.

En la segona prova es va realitzar amb les mostres de pinso (A i B), en les quals no es va fer el desgreixatge, se'n va reduir el temps d'incubació i no es va introduir el DMSO.

En un dels duplicats d'aquestes mostres es va introduir 500 µL de la solució de 2000 ppm de patró intern i se'n havia omès l'etapa de desgreixatge.

Per una banda, el pinso A té els següents resultats presentats en la Taula 19:

Les mostres en què s'ha introduït el patró intern se'n pot observar clarament el pic en la Imatge 9. Mentre que les mostres en què no s'ha introduït l'al·losa, presenten la carència d'aquest pic en el temps de retenció 10,1 minuts.



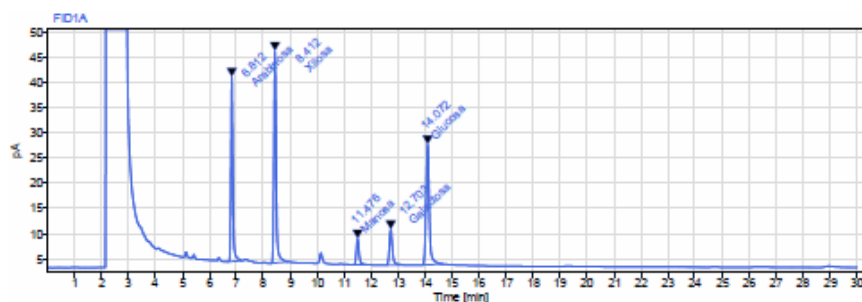
Imatge 9. Cromatograma del pinso A seguint les modificacions de la segona prova amb patró intern.

Monosacàrids	t _r (min)	1r resultat		2n resultat	
		Àrea	% Àrea	Àrea	% Àrea
Arabinosa	6,808	48,30	31,84	56,87	26,47
Xilosa	8,405	50,78	33,48	68,76	32,00
Manosa	11,473	6,34	4,18	9,17	4,27
Galactosa	12,695	7,98	5,26	13,24	6,16
Glucosa	14,052	38,28	25,24	66,81	31,10
Total			100		100

Taula 19. Resultats de les mostres de la segona prova de pinso A amb patró intern.

Els valors d'àrea donen similars entre ells i la relació del % d'àrea és molt similar tret d'algun compost que dista una mica en la Taula 19.

En aquest cas, es pot observar el cromatograma obtingut sense patró intern en la Imatge 10.



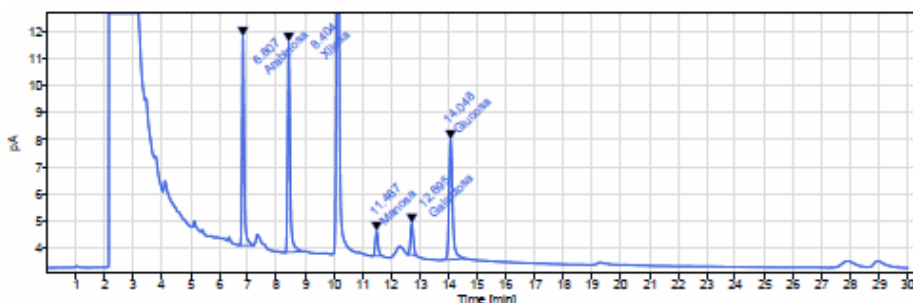
Imatge 10. Cromatograma de les mostres de la segona prova de pinso A sense patró intern

Monosacàrids	t _r (min)	1r resultat		2n resultat	
		Àrea	% Àrea	Àrea	% Àrea
Arabinosa	6,812	180,89	25,15	172,48	25,63
Xilosa	8,412	240,83	33,49	233,96	34,77
Manosa	11,476	37,46	5,21	36,06	5,36
Galactosa	12,703	55,98	7,78	51,53	7,66
Glucosa	14,072	204,05	28,37	178,87	26,58
Total			100		100

Taula 20. Resultats de les mostres de la segona prova de pinso A sense patró intern.

En aquest cas, els valors d'àrea també donen similar entre ells, indicant una bona repetibilitat dels resultats com es presenten en la Taula 20.

Per d'altra banda, en el pinso B s'han obtingut els següents resultats en la Imatge 11:



Imatge 11. Cromatograma de les mostres de la segona prova de pinso B amb patró intern.

Com es pot veure en el cromatograma, s'aprecia un pic molt gran en la tercera posició. Aquest és el patró intern introduït partint de la solució de 2000 ppm. Veient que la senyal dona tan alta respecte a la resta de pics, per a mostres futures, es podria introduir una concentració menor. També es pot observar que el pic de l'al·losa no està quantificat i es que la taula de calibratge utilitzada ha estat la provinent de la prova de calibratge 3, en la que no hi havia el patró intern.

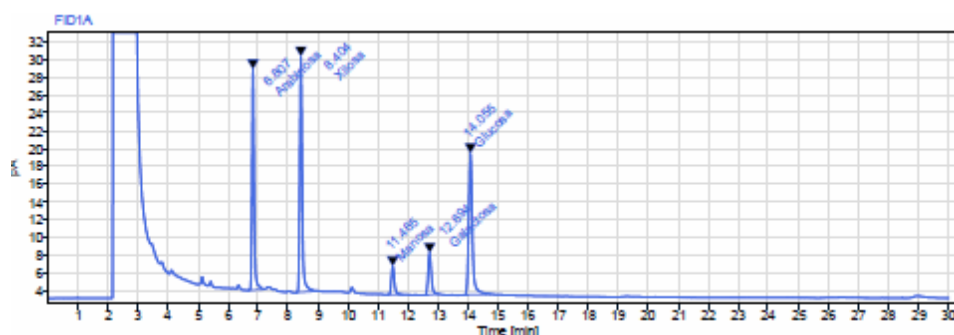
Els resultats obtinguts per la mostra B amb el patró intern ha estat els següent de la Taula 21:

Monosacàrids	t _r (min)	1r resultat		2n resultat	
		Àrea	% Àrea	Àrea	% Àrea
Arabinosa	6,807	39,70	28,73	32,76	35,76
Xilosa	8,404	46,06	33,33	38,46	41,97
Manosa	11,467	5,94	4,30	4,38	4,79
Galactosa	12,695	7,91	5,73	5,63	6,14
Glucosa	14,048	38,59	27,92	10,39	11,34
Total			100		100

Taula 21. Resultats de les mostres de la segona prova de pinso B amb patró intern.

De la mateixa manera que en la mostra anterior, els resultats del duplicat segueixen tenint una bona repetibilitat.

Pel que fa als resultat de la mostra B sense patró intern, també es pot veure l'omissió del pic clarament en la Imatge 12.



Imatge 12. Cromatograma de les mostres de la segona prova de pinso B sense patró intern.

Monosacàrids	t _r (min)	1r resultat		2n resultat	
		Àrea	% Àrea	Àrea	% Àrea
Arabinosa	6,807	123,16	26,38	109,66	31,13
Xilosa	8,404	151,27	32,40	150,38	42,68
Manosa	11,465	22,45	4,81	20,60	5,85
Galactosa	12,694	34,60	7,41	30,81	8,74
Glucosa	14,055	135,34	28,99	40,87	11,60
Total			100		100

Taula 22. Resultats de les mostres de la segona prova de pinso B sense patró intern.

En la Taula 22, es poden observar que els valors d'àrea també tenen una bona repetibilitat tot i que hi ha un compost, la glucosa que, en el segon resultat, sí que presenta una diferència significativa. Com que la tendència de la mostra és a tenir el nivell de glucosa elevat, es podria considerar aquest resultat com un "outlier".

En general, comparant entre tots els resultats de la prova, es pot observar una diferència en el resultat de les àrees que contenen patró intern respecte les que no el contenen. Això es degut a la introducció del patró intern, el qual el volum introduït fa que quan s'aplica, acaba diluint més els compostos que ja presenta la mostra.

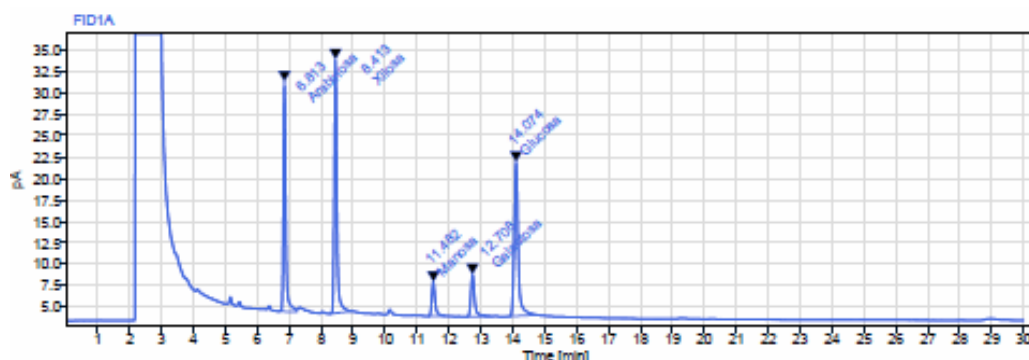
Tot i així, la relació de % d'àrea acaba sent molt similar entre ells. I per tant s'aconsegueix una bona repetibilitat.

A més a més, es poden observar que els resultats obtinguts són similars als que venen a continuació amb la tercera i quarta prova. En conseqüència, no seria necessari el pas de desgreixar per pinsos de porc amb un percentatge de greix entre 0 - 4% ja que no ha influït en els resultats finals.

5.1.3. Mostres realitzades amb la tercera prova.

En les mostres realitzades en aquesta prova es feia l'etapa de desgreixatge però per contra no es va posar el patró intern. A més a més, es va ometre la introducció de DMSO i el patró intern.

En la mostra A, es va obtenir el següent cromatograma de la Imatge 13:



Imatge 13. Cromatograma de les mostres de la tercera prova de pinso A sense patró intern.

Els cromatogrames obtinguts de la mostra A tenen el mateix aspecte que el mostrat en la Imatge 13 i els resultats de les quatre mostres analitzades són els mostrats a continuació en la Taula 23 i 24:

Monosacàrids	t _r (min)	1r resultat		2n resultat	
		Àrea	% Àrea	Àrea	% Àrea
Arabinosa	6,813	141,11	25,87	158,86	23,85
Xilosa	8,413	174,90	32,06	218,35	33,20
Manosa	11,482	29,28	5,37	32,43	4,93
Galactosa	12,708	40,50	7,42	46,75	7,11
Glucosa	14,074	159,67	29,27	203,34	30,92
Total			100		100

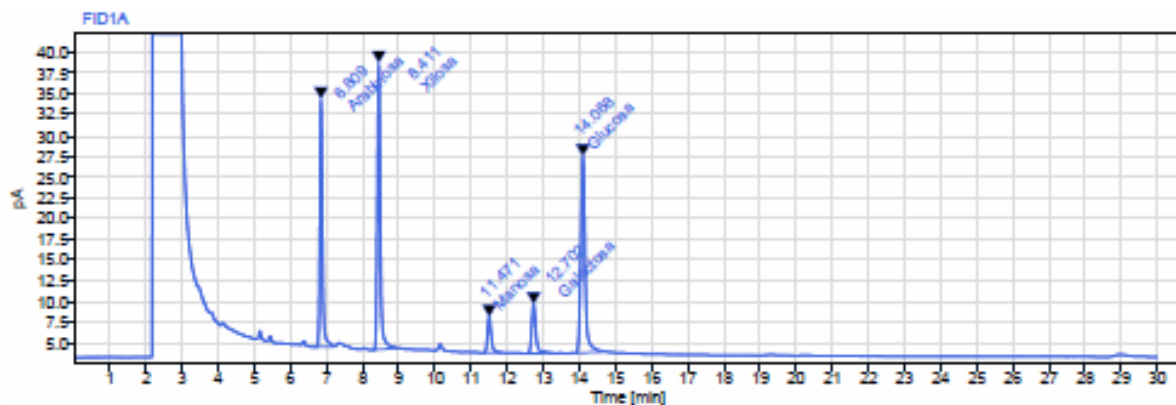
Taula 23. Resultats de la primera pesada de les mostres de la tercera prova de pinso A sense patró intern.

Monosacàrids	t _r (min)	1r resultat		2n resultat	
		Àrea	% Àrea	Àrea	% Àrea
Arabinosa	6,811	136,11	24,20	129,54	24,92
Xilosa	8,410	178,08	31,66	168,13	32,35
Manosa	11,472	29,50	5,24	27,14	5,22
Galactosa	12,706	42,58	7,57	36,30	6,98
Glucosa	14,069	176,23	31,33	158,64	30,52
Total			100		100

Taula 24. Resultats de la segona pesada de les mostres de la tercera prova de pinso A sense patró intern.

Es pot veure clarament la tendència a que els resultats siguin molt similars entre sí. Sobretot en el % d'àrea, el qual en tots els monosacàrids no disten gaire entre ells.

Pel que fa en la mostra B, el cromatograma que s'ha obtingut ha estat el de la Imatge 14:



Imatge 14. Cromatograma de les mostres de la tercera prova de pinso B sense patró intern.

Monosacàrids	t _r (min)	1r resultat		2n resultat	
		Àrea	% Àrea	Àrea	% Àrea
Arabinosa	6,809	150,34	24,01	170,09	26,45
Xilosa	8,411	199,08	31,79	212,54	33,05
Manosa	11,471	30,66	4,90	32,40	5,04
Galactosa	12,702	47,05	7,51	47,61	7,40
Glucosa	14,068	199,06	31,79	180,53	28,07
Total			100		100

Taula 25. Resultats de la primera pesada de les mostres de la tercera prova de pinso B sense patró intern.

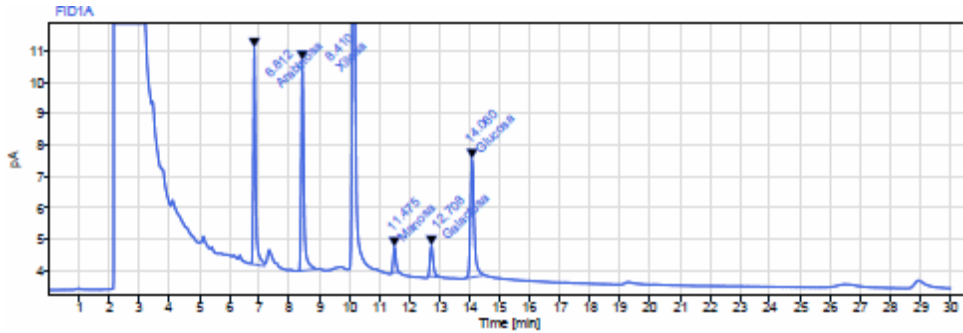
Monosacàrids	t _r (min)	1r resultat		2n resultat	
		Àrea	% Àrea	Àrea	% Àrea
Arabinosa	6,808	153,17	22,93	163,13	24,66
Xilosa	8,409	214,17	32,06	222,73	33,67
Manosa	11,467	32,72	4,90	34,09	5,15
Galactosa	12,696	47,55	7,12	48,73	7,37
Glucosa	14,068	220,44	33,00	192,76	29,14
Total			100		100

Taula 26. Resultats de la segona pesada de les mostres de la tercera prova de pinso B sense patró intern.

Observant els diferents resultats de la mostra B de la Taules 25 i 26, també es veu una bona relació entre ells, tant amb els valors d'àrea com amb el % d'àrea.

5.1.4. Mostres realitzades amb la quarta prova.

Les modificacions del mètode d'extracció d'aquestes mostres són les mateixes que en la prova anterior a excepció que en aquest cas s'ha introduït el patró intern. Pel que fa a la mostra de pinso A, els cromatogrames sortien com en la Imatge 15:



Imatge 15. Cromatograma de les mostres de la quarta prova de pinso A amb patró intern.

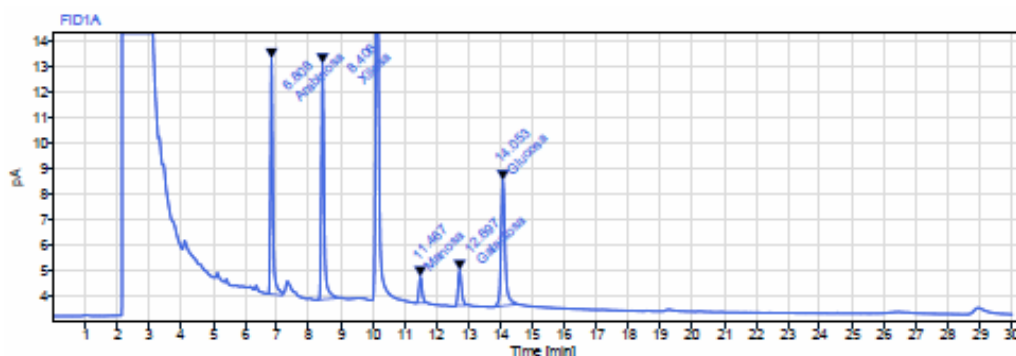
Monosacàrids	t _r (min)	1r resultat		2n resultat	
		Àrea	% Àrea	Àrea	% Àrea
Arabinosa	6,812	37,23	30,16	41,33	28,63
Xilosa	8,410	41,02	33,23	48,61	33,68
Manosa	11,475	5,02	4,07	6,26	4,34
Galactosa	12,708	7,17	5,81	7,91	5,48
Glucosa	14,060	33,00	26,73	40,22	27,87
Total			100		100

Taula 27. Resultats de la primera pesada de les mostres de la quarta prova de pinso A amb patró intern.

Monosacàrids	t _r (min)	1r resultat		2n resultat	
		Àrea	% Àrea	Àrea	% Àrea
Arabinosa	6,811	40,10	27,83	59,88	26,79
Xilosa	8,408	46,33	32,16	69,84	31,25
Manosa	11,480	6,94	4,81	10,66	4,77
Galactosa	12,701	8,54	5,93	14,74	6,60
Glucosa	14,062	42,16	29,26	68,37	30,59
Total			100		100

Taula 28. Resultats de la segona pesada de les mostres de la quarta prova de pinso A amb patró intern.

Pel que fa als resultats de la mostra de pinso B, són els següents com s'observa en la Imatge 16:



Imatge 16. Cromatograma de les mostres de la quarta prova de pinso B amb patró intern

Monosacàrids	t _r (min)	1r resultat		2n resultat	
		Àrea	% Àrea	Àrea	% Àrea
Arabinosa	6,808	48,43	29,47	49,06	27,02
Xilosa	8,406	55,54	33,80	58,40	32,16
Manosa	11,467	6,84	4,16	8,04	4,43
Galactosa	12,697	10,09	6,14	10,68	5,88
Glucosa	14,053	43,44	26,43	55,40	30,51
Total			100		100

Taula 29. Resultats de la primera pesada de les mostres de la quarta prova de pinso B amb patró intern.

Monosacàrids	t _r (min)	1r resultat		2n resultat	
		Àrea	% Àrea	Àrea	% Àrea
Arabinosa	6,806	56,89	27,10	64,60	27,56
Xilosa	8,404	67,94	32,37	80,26	34,24
Manosa	11,468	9,37	4,47	11,05	4,71
Galactosa	12,695	11,89	5,66	13,78	5,88
Glucosa	14,054	63,80	30,40	64,71	27,61
Total			100		100

Taula 30. Resultats de la segona pesada de les mostres de la quarta prova de pinso B amb patró intern.

Com es pot apreciar en les Taules 27, 28, 29 i 30, el valor de les àrees s'ha reduït considerablement en relació als resultats mostrats en la tercera prova. Això es degut a què la introducció del patró intern augmenta el volum en què es troben dissolts els compostos de la mostra. D'aquesta manera, l'àrea dels pics serà menor ja què els compostos es troben més diluïts. No obstant així, la relació en % d'àrea es manté i es pot observar que els resultats són bastant similars.

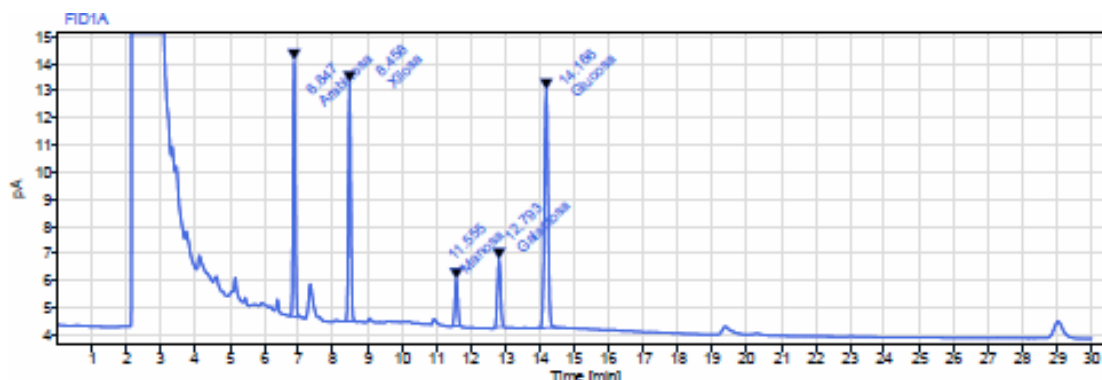
En les mostres de la segona i quarta prova, es va haver de repetir la derivatització ja què s'havia comès un error en la preparació d'un reactiu. Així doncs, es va poder introduir un patró intern més concentrat.

5.1.5. Mostres realitzades amb la cinquena prova.

En aquest cas, s'ha introduït prèviament a la incubació de la mostra amb els enzims, el DMSO i posteriorment, s'ha portat a ebullició durant una hora. Aquest dissolvent actua intentant alliberar d'una manera més senzilla el midó present a la mostra.

En aquest cas, en aquestes mostres és va introduir la solució de patró intern provinent de la solució mare de 2 ppm.

Pel que fa a la mostra A, el cromatograma obtingut ha estat el mostrat en la Imatge 17:



Imatge 17. Cromatograma de les mostres de la cinquena prova de pinso A amb patró intern.

La presència del patró intern no és pot veure. Això és degut a què aquestes mostres es van preparar amb la solució més diluïda de patró intern, la qual s'ha pogut comprovar que necessita estar més concentrada perquè aquest component pugui veure's als cromatogrames.

Els resultats d'àrees i pics han estat els de la Taula 31 i 32 per la mostra A:

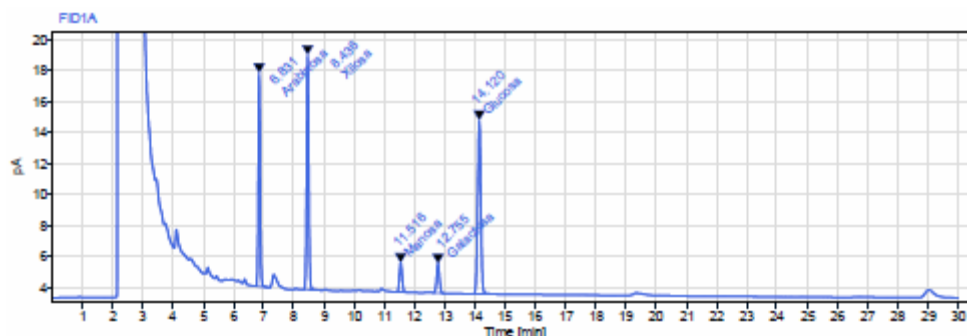
Monosacàrids	t _r (min)	1r resultat		2n resultat	
		Àrea	% Àrea	Àrea	% Àrea
Arabinosa	6,847	40,80	23,51	28,72	25,72
Xilosa	8,458	42,69	24,60	24,58	24,94
Manosa	11,555	9,96	5,74	7,29	6,59
Galactosa	12,793	16,01	9,23	9,94	8,99
Glucosa	14,166	64,04	36,91	37,34	33,76
Total			100		100

Taula 31. Resultats de la primera pesada de les mostres de la cinquena prova de pinso A amb patró intern.

Monosacàrids	t _r (min)	1r resultat		2n resultat	
		Àrea	% Àrea	Àrea	% Àrea
Arabinosa	6,811	40,43	23,67	38,63	23,59
Xilosa	8,408	46,78	27,38	44,90	27,42
Manosa	11,480	8,92	5,22	8,81	5,38
Galactosa	12,701	12,86	7,53	12,46	7,61
Glucosa	14,062	61,84	36,20	58,98	36,01
Total			100		100

Taula 32. Resultats de la segona pesada de les mostres de la cinquena prova de pinso A amb patró intern.

Pel que fa la mostra B, els resultats han estat els següents corresponents a la Imatge 18:



Imatge 18. Cromatograma de les mostres de la cinquena prova de pinso B amb patró intern.

Monosacàrids	t _r (min)	1r resultat		2n resultat	
		Àrea	% Àrea	Àrea	% Àrea
Arabinosa	6,833	55,49	24,66	58,96	24,89
Xilosa	8,437	69,18	30,74	73,66	31,10
Manosa	11,520	11,21	4,98	11,62	4,91
Galactosa	12,755	11,80	5,24	12,34	5,21
Glucosa	14,121	77,34	34,37	80,28	33,89
Total			100		100

Taula 33. Resultats de la primera pesada de les mostres de la cinquena prova de pinso B amb patró intern.

Monosacàrids	t _r (min)	1r resultat		2n resultat	
		Àrea	% Àrea	Àrea	% Àrea
Arabinosa	6,832	39,52	22,21	33,38	22,45
Xilosa	8,437	46,25	25,99	38,93	26,18
Manosa	11,520	10,10	5,68	8,25	5,55
Galactosa	12,756	12,99	7,30	10,72	7,21
Glucosa	14,120	69,10	38,83	57,42	38,61
Total			100		100

Taula 34. Resultats de la segona pesada de les mostres de la cinquena prova de pinso B amb patró intern.

En aquesta prova, es pot veure que els resultats obtinguts en la Taula 31, 32, 33 i 34 segueixen una tendència similar entre ells amb les diferents pesades fetes. Per tant, això significa que la repetibilitat entre els duplicats és bona.

No obstant, un altre punt a destacar és la comparació entre la quarta i la cinquena prova, en la qual s'ha omès la introducció de DMSO o per contra sí s'ha introduït respectivament abans de realitzar l'etapa enzimàtica. Observant els resultats, la teoria deia que el DMSO actuava ajudant a què l'extracció de midó fos més senzilla. Per tant les mostres que s'han dut a terme amb aquest dissolvent haurien de tenir un pic de glucosa inferior a les altres. No obstant, els resultats han estat al revés, tot i què una dada curiosa és que amb el DMSO, la quantitat de les hexoses ha augmentat, mentre que les pentoses han disminuït relativament. Aquest comportament no s'esperava i és repeteix en les dos mostres en que s'ha treballat. D'aquesta manera, es continuarà

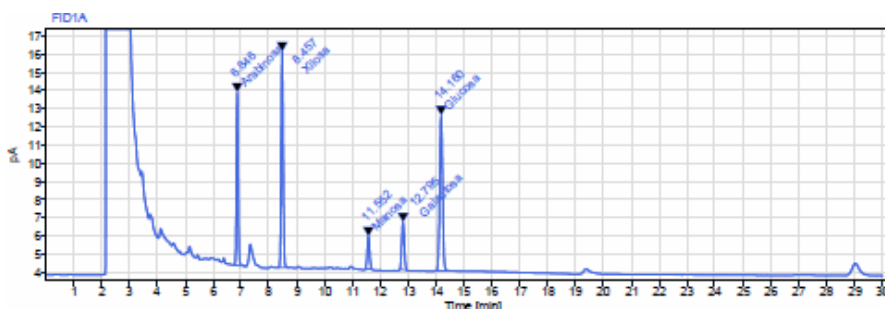
investigant quina relació pot tenir el DMSO amb els sucres que presenten una estructura d'hexosa.

A més a més, si es comparen els resultats obtinguts de la primera prova amb la metodologia que hi ha al laboratori amb la quarta i la cinquena prova, se'n pot observar que el resultats tendeixen a ser bastant més similars amb la quarta que amb la cinquena prova. Per tant, s'haurà de veure realment com afecta el DMSO a les mostres.

5.1.6. Mostres realitzades amb la sisena prova.

Finalment, per tenir més resultats aplicant el nou procediment, també es va realitzar en l'extracció de PNA en pinsos de pollastres. Les mostres van ser dos pinsos, pinso C i pinso D. Es va seguir els mateixos passos que en la cinquena prova i l'única diferència era el canvi de mostra. Cal destacar que en aquesta prova també es va introduir patró intern provinent de la solució de 2 ppm.

Pel que fa a la mostra C, el cromatograma obtingut en aquest cas ha estat el de la Imatge 19:



Imatge 19. Cromatograma de les mostres de la sisena prova de pinso C amb patró intern.

Monosacàrids	t _r (min)	1r resultat		2n resultat	
		Àrea	% Àrea	Àrea	% Àrea
Arabinosa	6,846	40,67	21,81	28,42	22,09
Xilosa	8,457	57,45	30,80	39,11	30,39
Manosa	11,552	10,47	5,61	7,62	5,92
Galactosa	12,795	16,67	8,94	11,50	8,94
Glucosa	14,160	61,26	32,84	42,02	32,66
Total			100		100

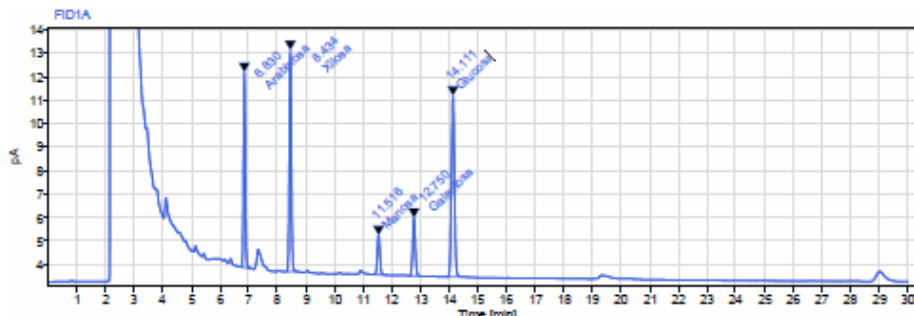
Taula 35. Resultats de la primera pesada de les mostres de la sisena prova de pinso C amb patró intern.

Monosacàrids	t _r (min)	1r resultat		2n resultat	
		Àrea	% Àrea	Àrea	% Àrea
Arabinosa	6,829	40,92	20,71	42,50	20,33
Xilosa	8,432	57,59	29,14	60,40	28,90
Manosa	11,514	12,00	6,07	12,70	6,08
Galactosa	12,747	18,31	9,27	19,19	9,18
Glucosa	14,111	68,80	34,81	74,21	35,51
Total			100		100

Taula 36. Resultats de la segona pesada de les mostres de la sisena prova de pinso C amb patró intern.

Aquestes mostres són de pinso de pollastre. Els resultats s'assemblen bastant als anteriors. Cal destacar que també s'ha introduït patró intern però de la solució més diluïda, 2 ppm. D'aquí que les àrees surtin més baixes però que no s'aprecii el pic.

Pel que fa a la mostra D, els resultats obtinguts han estat els mostrats en la Imatge 20:



Imatge 20. Cromatograma de les mostres de la sisena prova de pinso D amb patró intern.

Monosacàrids	t _r (min)	1r resultat		2n resultat	
		Àrea	% Àrea	Àrea	% Àrea
Arabinosa	6,830	35,87	21,95	29,88	20,93
Xilosa	8,434	45,75	28,00	38,92	27,25
Manosa	11,516	10,45	6,40	9,40	6,58
Galactosa	12,750	16,30	9,98	14,09	9,87
Glucosa	14,111	55,01	33,67	50,50	35,37
Total			100		100

Taula 37. Resultats de la primera pesada de les mostres de la sisena prova de pinso D amb patró intern.

Monosacàrids	t _r (min)	1r resultat		2n resultat	
		Àrea	% Àrea	Àrea	% Àrea
Arabinosa	6,829	43,48	22,95	35,87	21,71
Xilosa	8,434	55,96	29,54	47,77	28,91
Manosa	11,516	12,65	6,67	11,17	6,76
Galactosa	12,749	19,64	10,37	17,27	10,45
Glucosa	14,112	57,72	30,47	53,15	32,17
Total			100		100

Taula 38. Resultats de la segona pesada de les mostres de la sisena prova de pinso D amb patró intern.

En la mostra D succeeix el mateix que en les mostres C. La repetibilitat entre ells no ha estat tant bona i pot ser degut als problemes comentats anteriorment com pèrdua de mostra o pipetejar malament la quantitat necessària en el moment de dur a terme la derivatització.

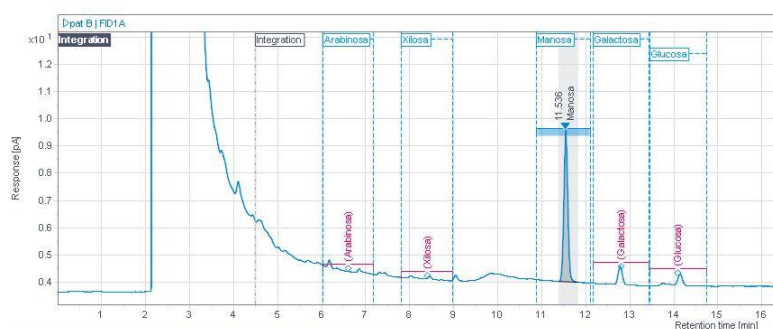
En general, podem observar que els resultats realitzats amb les diferents proves segueixen una bona repetibilitat, tot i haver pesat més mostra que en la primera prova realitzada amb la metodologia de la fitxa tècnica. Per tant, com que els valors de percentatge d'àrea segueixen una repetibilitat correcta, tret d'algun punt discrepant, podem determinar una reducció en el temps d'anàlisi de les mostres.

5.2. Taula de calibratge.

S'han realitzat diverses proves per aconseguir una bona taula de calibratge ja que es desconeixia si certes etapes del procés d'extracció dels PNA afectaven als patrons o, si encara que no afectessin, s'havien de tractar de la mateixa manera. Així doncs, els resultats obtinguts han estat els següents:

5.2.1. Preparació dels patrons amb la metodologia de calibratge 1.

Una vegada realitzada la preparativa dels patrons, la qual estava feta seguint totes les etapes que segueix una mostra (Annex 1), l'etapa enzimàtica, la precipitació dels PNA solubles, la hidròlisi i la derivatització, exceptuant l'etapa de desgreixatge. Es van introduir al cromatògraf donant lloc a diversos cromatogrames, segons el patró punxat.

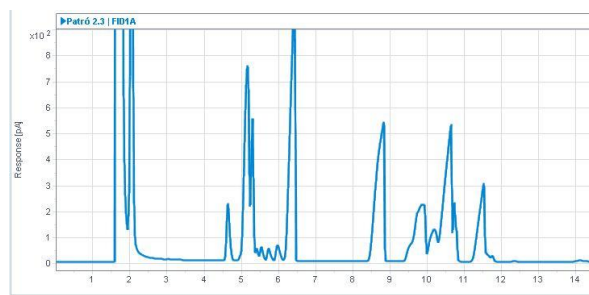


Imatge 21. Cromatograma dels patrons realitzats amb totes les etapes.

Com es pot observar en la Imatge 21, l'ordre d'elució dels components és arabinosa, xilosa, manosa, galactosa i glucosa. En aquest cromatograma es pot apreciar la zona en què haurien de sortir els diferents pics. No obstant, tant el pic de l'arabinosa com el de la xilosa no es troben presents, és a dir, no són resultats vàlids. D'aquesta manera, es procedeix a continuar introduint les altres proves al cromatògraf.

5.2.2. Preparació dels patrons amb la metodologia de calibratge 2.

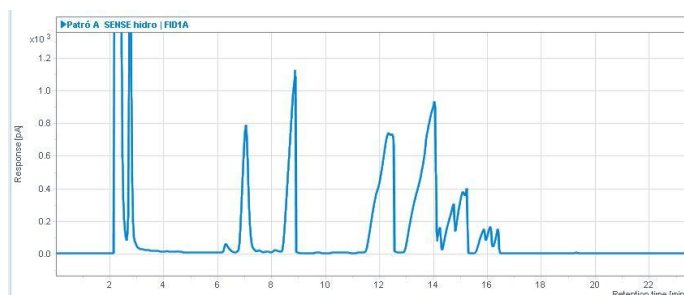
En aquesta prova, es realitzava la preparació dels patrons a partir de les diferents pesades i aplicant exclusivament l'últim pas de la fitxa tècnica, la derivatització (Annex). També es va introduir patró intern.



Imatge 22. Cromatograma dels patrons realitzats exclusivament amb l'etapa de derivatització per primer cop.

En relació a la Imatge 22, es pot observar que d'una banda, hi pot haver presència de contaminació del patró preparat ja que els pics obtinguts a partir del minut 10 no es poden donar per vàlids.

En aquest cas, es va voler repetir l'anàlisi, i es va dur de la mateixa manera una segona vegada però sense introduir patró intern.



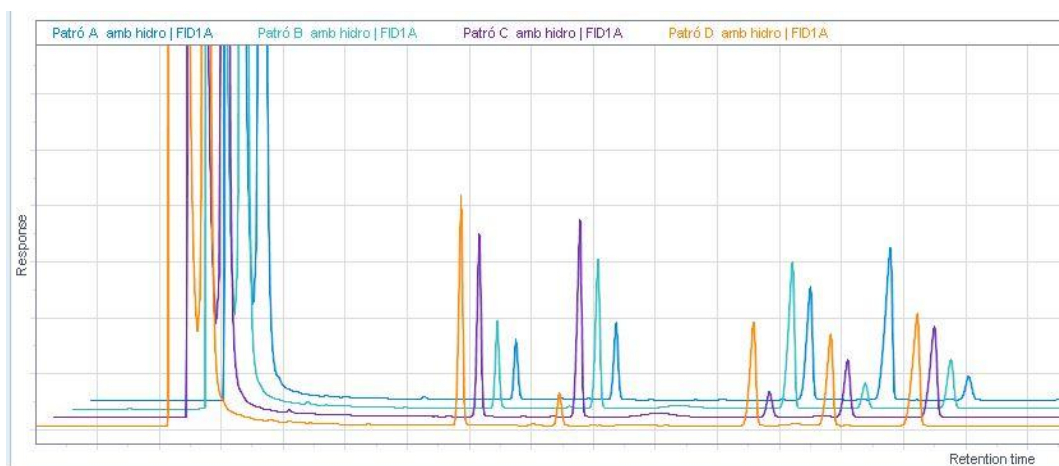
Imatge 23. Cromatograma dels patrons realitzats exclusivament amb l'etapa de derivatització per segon cop.

Així doncs, tal i com mostra la Imatge 23, es va concloure que la realització dels patrons mitjançant tant sols l'última etapa (derivatització) no era viable ja que els resultats en els diferents cromatogrames presentaven uns pics no quantificables. Un motiu que podria explicar aquests resultats és la dificultat en la que els diferents sucres es podien dissoldre ja que al principi de l'etapa el volum dels reactius introduïts és bastant reduït.

5.2.3. Preparació dels patrons amb la metodologia de calibratge 3.

En aquesta prova, els patrons es van tractar seguint la instrucció tècnica com si fossin mostres d'excretes, per tant, es pot observar que els volums dels reactius afegits en la hidròlisi varien. S'utilitza 1 mL d'àcid sulfúric i 11 mL d'aigua. (Annex).

En els patrons preparats amb l'etapa d'hidròlisi i derivatització, es podia observar certa millora en relació a la dificultat de solubilitat que es tenia respecte l'anterior prova de calibratge.



Imatge 24. Cromatograma dels patrons realitzats amb hidròlisi i derivatització.

Com es pot veure en la Imatge 24, aquests resultats van esdevenir vàlids ja que se'n podia extreure la taula de calibratge per tal de poder quantificar les mostres. Com que

cada patró tenia una quantitat de sucre diferent, es podia obtenir la recta de calibratge per cada monosacàrid.

D'aquesta manera, es va calcular les concentracions dels sucres que s'havia introduït en cada patró.

El càlcul de les concentracions es va dur a terme a partir del següent factor de conversió:

$$\frac{g \text{ de patró introduït}}{V \text{ aforat}} \cdot \frac{0,2 \text{ mL}}{2 \text{ mL}} \cdot \frac{10^6 \mu}{1g} \cdot \frac{1 \text{ mL}}{10^3 \mu L} = \text{Quantitat } \mu g / \mu L$$

El volum aforat és la suma dels reactius utilitzats en l'etapa d'hidròlisi, 12 mL. D'aquesta solució mare, se'n pren 0,2 mL per realitzar l'etapa de derivatització. Després del procediment, els sucres acabaran a la part orgànica, el diclòrmetà, el qual s'introdueix 2 mL.

Exemple: En el patró 1, s'hi introdueix 0,0190 g d'arabinosa.

$$\frac{0,0190 \text{ g}}{12 \text{ mL}} \cdot \frac{0,2 \text{ mL}}{2 \text{ mL}} \cdot \frac{10^6 \mu}{1g} \cdot \frac{1 \text{ mL}}{10^3 \mu L} = 0,1583 \mu g / \mu L$$

Es segueix el mateix càlcul per aconseguir saber totes les concentracions dels diferents monosacàrids en els quatre patrons mostrats en la Taula 39.

Monosacàrid	Patró 1 ($\mu g / \mu L$)	Patró 2 ($\mu g / \mu L$)	Patró 3 ($\mu g / \mu L$)	Patró 4 ($\mu g / \mu L$)
Glucosa	0,1100	0,2667	0,5167	0,7742
Manosa	0,5383	0,8042	0,1158	0,2833
Arabinosa	0,1583	0,2642	0,5550	0,7750
Xilosa	0,2642	0,5825	0,7775	0,1358
Galactosa	0,7667	0,1142	0,2742	0,5117

Taula 39. Concentracions de cada monosàcarid en els patrons.

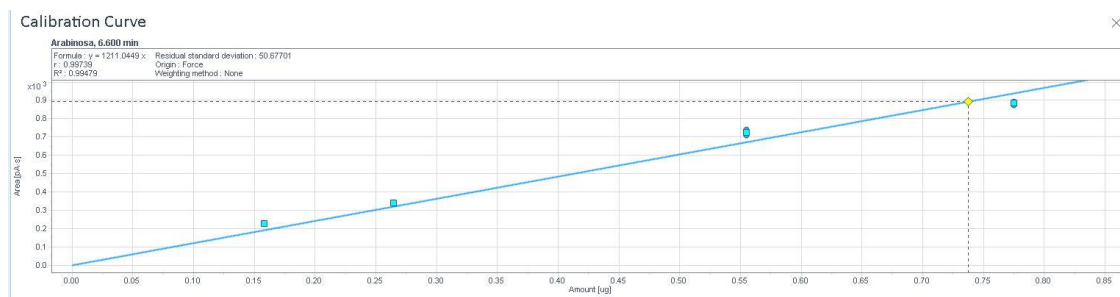
A partir d'aquestes concentracions, s'obtenen les diferents rectes de calibratge corresponents a cada sucre.

Cal destacar que s'intenta obtenir el R^2 més elevat possible. Per tant s'usa una equació lineal i es força passar la recta pel punt (0, 0). Dient a terme això, la forma de l'equació serà:

$$y = mx$$

5.2.3.1. Recta de calibratge de l'arabinosa.

Com es presenta a continuació, la recta està formada pels quatre punts originats pels nivells corresponents i es representa en funció dels μg de sucre (eix de les x) vers l'àrea obtinguda (eix de les y).

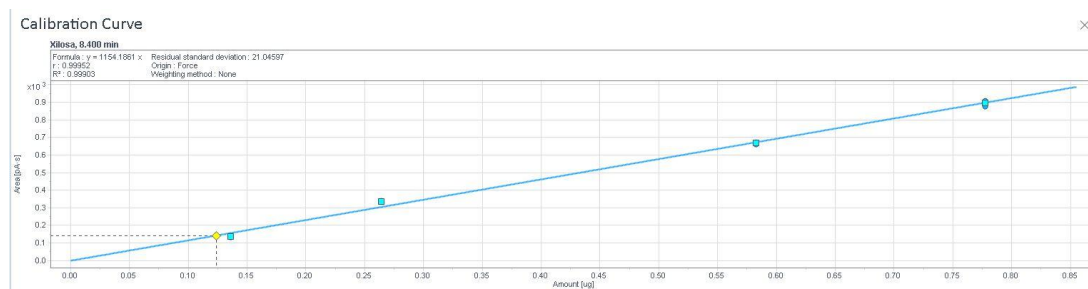


Imatge 25. Recta de calibratge de l'arabinosa.

La recta obtinguda en la Imatge 25 és $y = 1211,0449x$. El pic de l'arabinosa és el primer en sortir i ho fa en el minut 6,9. Forçant el pas de la recta per l'ordenada a l'origen s'aconsegueix un $R^2 = 0,99479$. Per tant, podem donar per vàlida la recta.

5.2.3.2. Recta de calibratge de la xilosa.

En segon lloc, succeeix el mateix que l'anterior compost. La recta de calibratge està formada pels quatre punts obtinguts pels patrons i representa els µg de sucre (eix de les x) vers l'àrea obtinguda (eix de les y) .

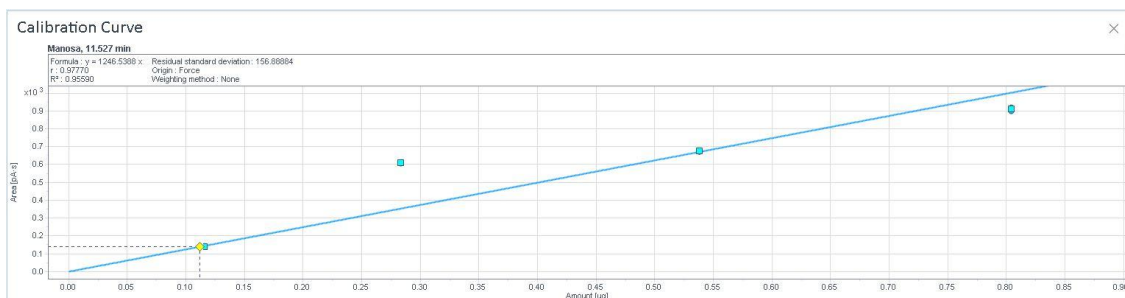


Imatge 26. Recta de calibratge de la xilosa.

La recta obtinguda en la Imatge 26 és $y = 1154,1861x$. El temps de retenció d'aquest monosacàrid és el minut 8,4. Es pot donar la recta com a correcta ja que el $R^2=0,99903$.

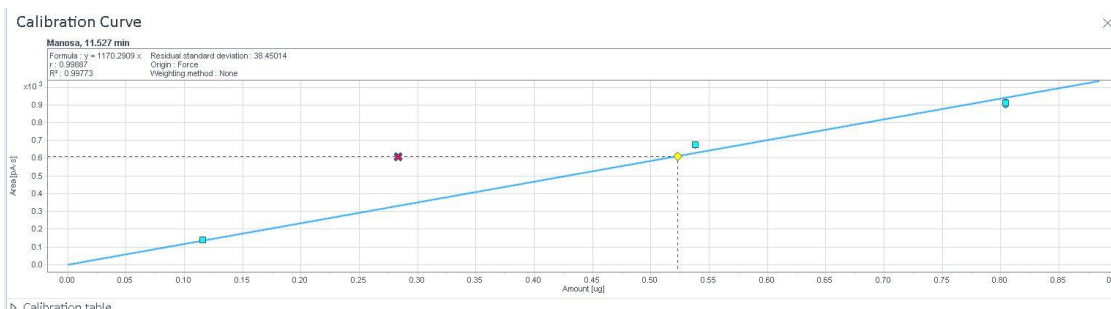
5.2.3.3. Recta de calibratge de la manosa.

Es continua realitzant la mateixa recta de calibratge que en els sucres anteriors però amb els valors de la manosa. Continua representant-se els µg de sucre (eix de les x) vers l'àrea obtinguda (eix de les y)



Imatge 27. Recta de calibratge de la manosa amb el segon punt com outlier.

Com es pot apreciar en la Imatge 27, en aquesta recta hi ha un punt discrepant que fa que el $R^2 = 0,95590$. Per millorar aquest paràmetre, s'elimina aquest punt ja que es tracta d'un "outlier".

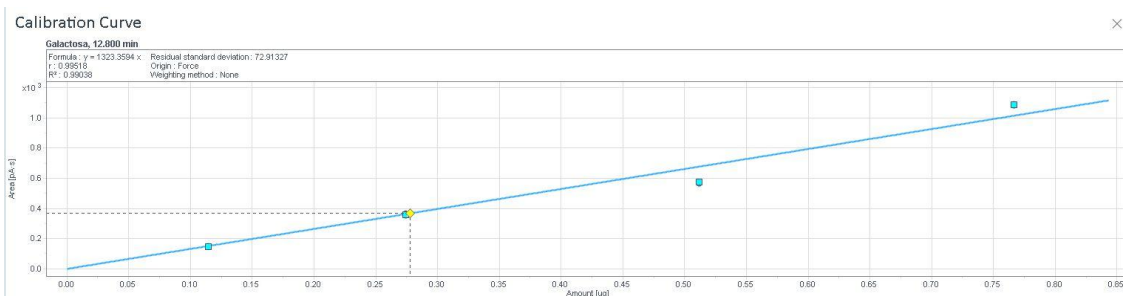


Imatge 28. Recta de calibratge de la manosa ometent l'outlier.

D'aquesta manera en la Imatge 28, s'aconsegueix millorar el coeficient de correlació, el qual esdevé $R^2 = 0,99773$. La recta de calibratge acaba sent $y = 1170,290x$. La manosa surt amb un temps de retenció aproximat de 11,527 minuts.

5.2.3.4. Recta de calibratge de la galactosa.

La quarta recta de calibratge és per la galactosa. Es continua realitzant el mateix procediment per donar lloc als quatre patrons i així aconseguir la corresponent recta corresponen a la Imatge 29. La recta representa els μg de sucre (eix de les x) vers l'àrea obtinguda (eix de les y)

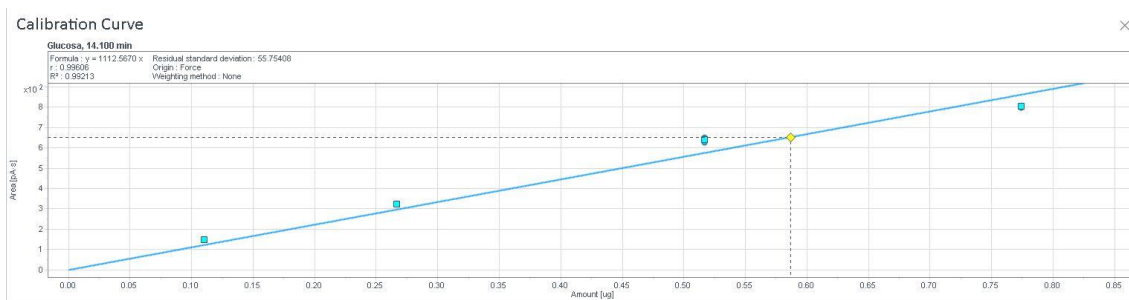


Imatge 29. Recta de calibratge de la galactosa.

Com es pot observar, tot i que el tercer punt podria ser un outlier, el R^2 de l'equació és de 0,99038. Així doncs, es pot veure que no és tan problemàtic com en el cas anterior. La recta que s'aconsegueix és $y = 1323,3594x$. La galactosa es detecta a un temps de retenció de 12,800 minuts aproximadament.

5.2.3.5. Recta de calibratge de la glucosa.

Per últim, la recta de calibratge de la glucosa es duu a terme com els compostos anteriors. La recta representa els μg de sucre (eix de les x) vers l'àrea obtinguda (eix de les y) i es pot observar en la Imatge 30.



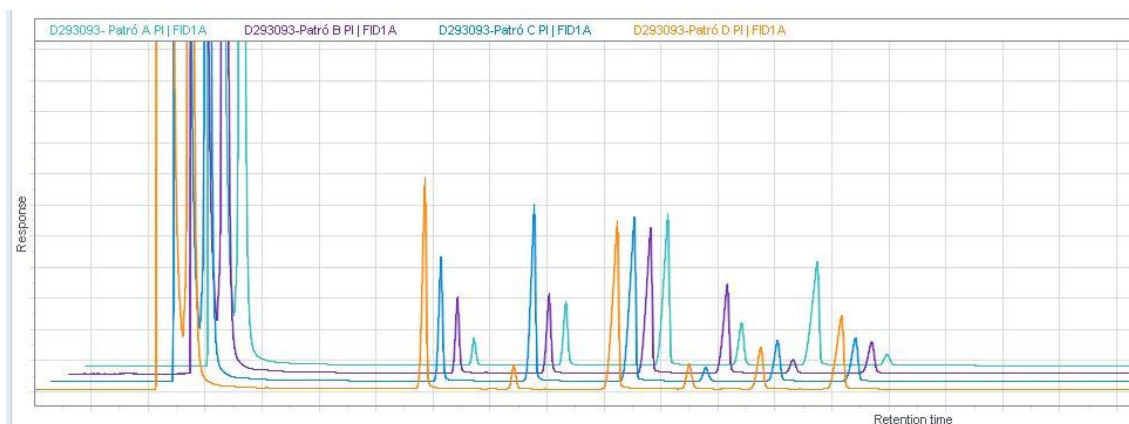
Imatge 30. Recta de calibratge de la glucosa.

La recta de calibratge obtinguda és $y = 1112,5670x$. La glucosa és l'últim compost que surt en el cromatograma i surt amb un temps de retenció de 14,100 minuts. . El $R^2 = 0,99213$, per tant la recta es pot donar per vàlida.

5.2.4. Preparació dels patrons amb la metodologia de calibratge 4.

Com a última prova, i després d'haver observat que realitzar la derivatització directa a partir dels sucres sense diluir no funcionava, es va provar de fer solucions mare i introduir en cada patró un volum de cada monosacàrid diferent.

Cal destacar que, en aquest cas, es va realitzar introduint patró intern, l'al·losa, amb una solució més concentrada ja que en altres analítiques no s'apreciava el pic.



Imatge 31. Patrons realitzats a partir de solucions mare i patró intern.

En la Imatge 31, es pot veure la diferència en relació a les altres proves ja que el tercer pic, el qual es manté constant en els quatre patrons, correspon al patró intern introduït, l'al·losa. Pel que fa a les altres senyals, també s'aprecien diferents punts corresponents a les diferents concentracions, les que permeten determinar les diferents rectes de calibratge.

Com que no es sabia la concentració que aniria bé de patró intern per tal que es pogués visualitzar correctament, se n'ha anat provant de diferents. I s'ha pogut determinar una altra manera correcta de fer els patrons, en la qual s'estalvia fer tots els passos que requereix una mostra. A més a més, es redueix el temps de preparació a un dia, de manera que l'opció utilitzada són dos dies.

A part, com es pot observar a continuació, les mostres presenten una concentració de sucres molt menor als patrons preparats. En el moment de tornar a preparar patrons i implementar el patró intern, caldrà doncs reduir la concentració d'aquests. La solució de patró intern que s'ha introduït en la prova de calibratge 4 partia d'una concentració de 16.000 ppm, la qual s'ha pogut observar massa concentrada.

D'aquesta manera, encara que els procediment és correcte, els valors obtinguts en els patrons són massa elevats en comparació amb les mostres. Es fixa com a taula de calibratge la prova calibratge 3 amb la qual s'ha obtingut bons cromatogrames i rectes de calibratge.

6. CONCLUSIONS.

Català.

Pel que fa a les mostres, es pot concloure que s'ha de continuar investigant si l'etapa de desgreixatge afecta o no als resultats ja que en les mostres on s'ha omès el pas, no s'ha vist massa diferència. S'hauria de continuar provant possiblement en mostres que tinguessin un % de greix més elevat per valorar la possibilitat d'eliminar l'etapa o no. També destacar que els resultats obtinguts entre les mostres que presentaven la introducció de DMSO vers les que no, no han estat els esperats. D'aquesta manera, serà una altra consideració a tenir en compte per continuar desenvolupant en el moment de decidir la metodologia escollida per implementar en el laboratori, ja sigui la utilitzada en la quarta o la cinquena prova. A partir dels resultats aconseguits, el procediment corresponent a la quarta prova seria el més indicat ja que el pic de glucosa surt més baix, això ens indica que pot haver una menor possibilitat de que part d'aquesta glucosa provingui del midó no extret. Tanmateix, la determinació i quantificació dels PNA es pot dur a terme amb altres tipus de mostra com continguts intestinals, excretes, etc. Així doncs, també s'hauria de fer proves a aquestes aplicant aquestes modificacions per veure'n els resultats obtinguts i observar si podria ser viable el nou procediment. Tot i així, a primera vista, se'n podria reduir el temps d'anàlisi de les mostres.

Pel que fa a l'ús del patró intern, s'haurà de continuar estudiant la concentració que s'ha de posar a les mostres ja que s'ha observat que tant la solució de 16.000 ppm com la de 2000 ppm d'al·losa presenten una concentració massa alta.

En relació a la recta de calibratge, tot i que la metodologia utilitzada pel laboratori aplicant l'etapa d'hidròlisi i derivatització és correcta, la utilització de solucions mare és la millor opció, ja que s'obtenen resultats equiparables i es redueix el temps de dedicació en la preparació dels patrons. A més a més, s'evitarà l'ús d'àcid sulfúric, el qual no és rellevant en aquest pas.

Finalment, es pot concloure que el desenvolupament dut a terme en aquest treball servirà per aplicar noves millores en aquesta tècnica. I en un futur, quan s'hagin pogut realitzar més proves, poder aconseguir reduir el temps de preparació necessari de les mostres.

English

Regarding to the optimization of the sample extraction procedures, it can be concluded that it is necessary to continue investigating whether the degreasing is necessary or not since in the samples where the step was omitted, did not differ too much with the ones in which it is performed. The test of samples with a higher fat percentage should be carried out to assess the possibility of eliminating this stage or not. Also, it has remarked that the results obtained among the samples with or without DMSO have not been expected. Based on the results obtained, the procedure followed in the 4th determination would be the most appropriate because the glucose level was lower than in other methods. Therefore, there was a low probability of having glucose from non extracted starch. Before to consider validated the proposed modifications, the determination and quantification of NSP's PNA's should be carried out with other types samples such as intestinal contents, faeces, etc, in which this procedures is usually carried out. However, it could be possible to reduce the determination's time.

Regarding the use of an internal standard, it can be concluded that it is necessary to continue studying the concentration that must be applied in the samples since it has been observed that both solutions of 16,000 ppm and that of 2000 ppm of allose the concentration is either too high or too low.

In relation to the calibration, although the methodology used by the laboratory applying the hydrolysis and derivatization stage is correct. The use of mother solutions is the best option, as comparable results are obtained and the time that is dedicated to the preparation of patterns could reduce. In addition, the use of sulfuric acid, which is not relevant in this step, is avoided.

Finally, it can be concluded that the development carried out in this work to reduce the preparation time of the samples will serve to apply new improvements in this technique and in the future, when more tests will be available.

7. **BIBLIOGRAFIA.**

1. Englyst HN, Cummings JH. Simplified method for the measurement of total non-starch polysaccharides by gas - liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. *Analyst*. 1984;109(7):937-942. doi:10.1039/an9840900937
2. Englyst HN, Cummings JH. Improved method for measurement of dietary fiber as non-starch polysaccharides in plant foods. *J Assoc Off Anal Chem*. 1988;71(4):808-814. doi:10.1093/jaoac/71.4.808
3. Slominski BA, Campbell LD. Non- starch polysaccharides of canola meal: Quantification, digestibility in poultry and potential benefit of dietary enzyme supplementation. *J Sci Food Agric*. 1990;53(2):175-184. doi:10.1002/jsfa.2740530205
4. Vangsøe CT, Bonnin E, Joseph-Aime M, Saulnier L, Neugnot-Roux V, Bach Knudsen KE. Improving the digestibility of cereal fractions of wheat, maize, and rice by a carbohydrase complex rich in xylanases and arabinofuranosidases: an in vitro digestion study. *J Sci Food Agric*. 2021;101(5):1910-1919. doi:10.1002/jsfa.10806
5. McCleary B V., Gibson TS, Mugford DC. Measurement of Total Starch in Cereal Products by Amyloglucosidase- α -Amylase Method: Collaborative Study. *J AOAC Int*. 1997;80(3):571-579. doi:10.1093/jaoac/80.3.571
6. Bach Knudsen KE. Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. *Anim Feed Sci Technol*. 1997;67(4):319-338. doi:10.1016/s0377-8401(97)00009-6
7. Jaworski NW, Lærke HN, Bach Knudsen KE, Stein HH. Carbohydrate composition and in vitro digestibility of dry matter and nonstarch polysaccharides in corn, sorghum, and wheat and coproducts from these grains¹. *J Anim Sci*. 2015;93(3):1103-1113. doi:10.2527/jas.2014-8147
8. Ma J, Adler L, Szrednicki G, Arcot J. Quantitative determination of non-starch polysaccharides in foods using Gas Chromatography with flame ionization detection. *Food Chem*. 2017;220:100-107. doi:10.1016/j.foodchem.2016.09.206
9. Villanueva-Suárez MJ, Redondo-Cuenca A, Rodríguez-Sevilla MD, De las Heras Martínez M. Characterization of nonstarch polysaccharides content from different edible organs of some vegetables, determined by GC and HPLC: Comparative study. *J Agric Food Chem*. 2003;51(20):5950-5955. doi:10.1021/jf021010h
10. Choct M. Feed non-starch polysaccharides: Chemical structures and nutritional significance. *Feed Milling Int*. 1997;(June Issue):13-26.
11. Vol A, Patricia D, Laverde A. Efectos nutricionales de los polisacáridos no amiláceos en pollo de engorde de la línea Ross Nutritional impact of non-starch polysaccharides in broilers Ross line. *Rev Cienc y Agric*. 2013;10(1):39-45. http://revistas.uptc.edu.co/revistas/index.php/ciencia_agricultura/article/view/2826/2594
12. Fernández JI. Polisacáricos no amiláceos y complejos multienzimáticos ; cómo mejorar el valor nutricional del pienso. Published online 2011:19-22.

13. Snyder J, Sowokinos J, Desborough S. Concentration of DMSO for Optimal Starch Solubility Effect of DMSO on HCl Hydrolysis and Glucose Quantitation Via Glu-. *Am Potato J*. Published online 1977:513-517.
14. Englyst HN, Quigley ME, Hudson GJ. Determination of dietary fibre as non-starch polysaccharides with gas-liquid chromatographic, high-performance liquid chromatographic or spectrophotometric measurement of constituent sugars. *Analyst*. 1994;11(July):1497-1509. doi:10.1039/AN9941901497

8. ANNEX

La fitxa tècnica utilitzada en aquests moments al laboratori és la que es troba a continuació. Cal destacar que el treball es centra exclusivament en la part cromatogràfica del procediment.

PROCEDIMENT ANALÍTIC.

Es pot fer només la determinació cromatogràfica (CR), la determinació colorimètrica (CL) o les dues al mateix temps (CRL).

1r dia

1. Pesar la quantitat de mostra adient en funció de la tècnica que volem emprar:

per a CR: 0,5 g de mostra

per a CL: 0,2 g de mostra

per a CRL: 0,2 g de mostra

2. Si la mostra té un 90-100% M.S. i menys del 2-3% de greix es continua en el punt 3. Si no, cal extreure el greix de la següent manera:

2.a. Afegir 30 mL d'acetona.

2.b. Agitar durant 30 min i centrifugar durant 15 min i 20°C a 4000 RPM.

2.c. Separar la fase líquida i assecar la mostra posant-la en un bany d'H₂O a 70°C.

2n dia

3. Afegir 1 mL d'etanol del 85% homogeneïtzar. Afegir 2 mL de DMSO homogeneïtzar i posar en un bany a ebullició durant 1 hora. Comptar el temps de que la mostra bulli. Agitar cada cert temps.

4. Escalfar el tampó a 45°C i posar 8 mL de tampó per tub, agitar immediatament.

5. Refredar els tubs a 45°C i afegir 200µL amiloglucosidasa i 200µL d'a-amilasa.

6. Incubar durant 18h a 45°C preferiblement amb agitació continuada.

3r dia

7. Afegir 25 mL d'etanol absolut, homogenitzar i deixar 1 hora a temperatura ambient.

8. Centrifugar a 4000RPM i a 20°C durant 15 min.

9. Treure el sobrenedant i repetir l'operació 2 vegades més amb 30 mL d'etanol 85%.

10. Afegir 30 mL d'acetona, agitar durant 5 minuts i després centrifugar. Treure el sobrenedant i assecar la mostra al bany a 70°C.

El 4rt i 5è dia seran en funció de la determinació:

4t dia

39. Afegir 0,5 mL de H₂SO₄ 12 M per pinsos i matèries primeres.

Afegir 1 mL de H₂SO₄ 12 M per excretes i continguts.

Agitar i posar durant 1 hora en un bany a 37°C.

40. Passat aquest temps, afegir 5,5 mL d'aigua per pinsos i matèries primeres i 11 mL d'aigua per excretes i continguts. Homogeneïtzar.

41. Posar tots els tubs durant 2 hores a 110°C.

42. Refredar els tubs a T.A.

5è dia (acabament determinació cromatogràfica)

53. Deixar una estona a temperatura ambient i agafar alíquotes del sobrenedant de 0,2 mL.

54. Afegir 0,1 mL de NH₃ 12 M i homogeneïtzar.

55. Afegir 0,5 mL de borohidrur de Na al 2% en DMSO.

56. Homogeneïtzar i posar durant 90 minuts a 40°C.

57. Refredar durant 10 minuts i afegir 0,1 mL i afegir 0,1 mL d'àcid acètic, agitar vigorosament.

58. Afegir 0,2 mL d'1-metil-imidazole i 2 mL d'anhídrid acètic, agitar i deixar reposar durant 15 minuts.

59. Afegir 5 mL d'H₂O agitar i deixar refredar en un bany de gel durant 15 minuts.

60. Afegir 2 mL de diclorometà homogeneïtzar i deixar separar fases. Filtrar i punxar en el cromatògraf.