

**Dulcenombre de Maria Moreno Gómez**

**VALIDACIÓ D'UN MÈTODE PER A LA DETERMINACIÓ DE  
PIGMENTS EN PINSO**

**TREBALL DE FI DE GRAU**

**dirigit pel Dr. David Ribera**

**Grau de Química**



**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI**

**Tarragona**

**2014**

## **Índex**

Abstract .....	3
1. Objectiu .....	4
2. Introducció .....	4
2.1 Novus Spain .....	4
2.2 Pigments .....	4
3. Fonaments .....	6
3.1 Cromatografia líquids .....	6
4. Part experimental .....	6
4.1 Mètode d'anàlisi .....	6
4.2 Optimització del mètode .....	8
4.2.1 Saponificació o no saponificació .....	8
4.2.2 Quantitat de pinso .....	9
4.2.3 Temps de saponificació .....	11
4.2.4 Desencapsulació de la cantaxantina .....	14
4.3 Factor de resposta .....	16
4.4 Preparació de les rectes patrons .....	17
4.4.1 Anàlisi dels patrons a utilitzar .....	17
4.4.2 Preparació de la recta de calibratge .....	18
4.4.3 Recta de la t-luteïna .....	19
4.4.4 Cantaxantina .....	25
4.4.5 Beta-carotè .....	29
4.4.5 Determinació dels factors de resposta .....	32
5. Resultats .....	33
5.1 Mostres utilitzades per la validació del mètode .....	33
5.2 Selectivitat .....	33
5.3 Linealitat .....	34
5.4 Robustesa .....	35
5.4.1 Variació de pes .....	35
5.4.2 Agitació o no agitació .....	37
5.5 Precisió .....	37
5.6 Repetibilitat .....	38
5.7 Reproductibilitat .....	41

5.8 Límit de detecció i límit de quantificació .....	41
5.9 Recuperació.....	45
6. Conclusions .....	46
7. Bibliografia .....	47

## **Abstract**

The objective of this work is to develop and validate a quantitative method of analysis for the determination of trans-lutein and trans-canthaxanthin in feed. Both lutein and canthaxanthin are pigments, called carotenoids that belong to the xanthophylls family. Carotenoids have a spectrum in the visible rang of the electromagnetic spectrum that is used for their determination.

The method used previously consisted in pigment determination using UV-visible spectroscopy. This was an approximated method since all pigments in feed absorb in this range of wavelength and the method is not selective. Then, the determination of one of the carotenoids in a mixture is difficult and we need to apply other techniques like HPLC to have an approximate value of the target analyte.

The method used and validated in this work is based on HPLC which allows us to determinate the analytes separately. Due to HPLC has a DAD detector the analytical method will be able to determinate every single pigment that we want to quantify in their maximum of absorbance. As carotenoid standards are expensive, it is applied a method that uses a factor that correlates the response of the cheapest pigment with the rest in the mixture. We quantify the target pigment with the calibration curve of beta-carotene and with the response factor we get the different pigment concentrations.

## **1. Objectiu**

-Determinació dels pigments luteïna i cantaxantina mitjançant cromatografia de líquids amb un equip HPLC.

- Validar el mètode.

L'objectiu d'aquest treball és traslladar i validar un mètode d'anàlisi de carotenoides en pinso de l'anàlisi mitjançant l'espectrofotòmetre a mitjançant una cromatografia de líquids amb un equip HPLC.

## **2. Introducció**

### **2.1 Novus Spain**

Per analitzar carotenoides en pinso el mètode utilitzat i validat fins al moment era un mètode que utilitzava per determinar la quantitat de carotenoides totals l'espectrofotòmetre i a través d'una cromatografia de líquids es treia el percentatge que hi havia de cada carotenoide.

La realització d'aquest treball ha estat al departament de R+D de l'empresa Novus Spain S.A., ubicada a l'edifici CEPID del tecnoparc de Reus. Aquesta empresa es dedica al desenvolupament i producció d'additius alimentaris per l'alimentació animal.

El treball ha estat desenvolupat dins de l'àrea relacionada amb els pigments, la mateixa àrea en la qual vaig realitzar les meves pràctiques externes.

### **2.2 Pigments**

Els pigments són components que absorbeixen llum en la regió de longituds d'ona del visible. Els pigments s'utilitzen com a colorants alimentaris en la indústria de l'alimentació degut a diverses raons com: restaurar l'aparença original, assegurar la uniformitat del color, intensificar els colors del menjar, protegir altres components com són els antioxidants, obtenir una millor aparença, mantenir les característiques associades amb l'aliment i ajudar com una característica visual de qualitat de l'aliment. [1]

Els colorants com a additius van ser una dels primers productes fabricats per l'home regulats per llei.

Els pigments analitzats en aquest treball pertanyen a la família dels carotenoides. Els carotenoides són compostos constituïts per 8 unitats d'isoprè que es troben unides en un patró cap-cua i l'ordre s'inverteix en el centre. Segons la seva estructura química es poden classificar en dos grups: carotens i xantofil·les. Les xantofil·les són aquells carotenoides que tenen algun oxigen

a la seva estructura, fent així que tal com es pot veure a partir de les seves estructures en les figures 1, 2 i 3, tan la luteïna com la cantaxantina seran considerades xantofil·les i el beta-carotè un carotè.

Els carotenoides han estat utilitzats com a colorants alimentaris durant segles.

Els carotenoides han estat associats amb la seva capacitat antioxidant en estudis *in vitro* i *in vivo*. [2] Aquesta activitat dependrà en les condicions mesurades. La luteïna amb el seu isòmer la zeaxantina són pigment grocs que pertanyen al grup de carotenoides sense activitat vitamínica A. La luteïna es troba de forma natural i majoritàriament en les fulles de coloració verd fosca i la zeaxantina al gra del blat de moro. S'han fet estudis on es demostra que la luteïna i la zeaxantina contribueixen a la salut i alenteixen la degeneració macular relacionada amb l'envelliment i en menor mesura, el càncer i malalties del cor. [3]

Al canviar de l'alimentació natural de l'aviram a la utilització del pinso com a font d'alimentació es va notar decoloració en la carn i en el rovell dels ous. A l'incorporar luteïna al pinso el que fa es donar-li un color més groc al rovell i a la carn. La cantaxantina al ser un pigment vermell ajudarà a que doni el color taronja del rovell més fàcilment.

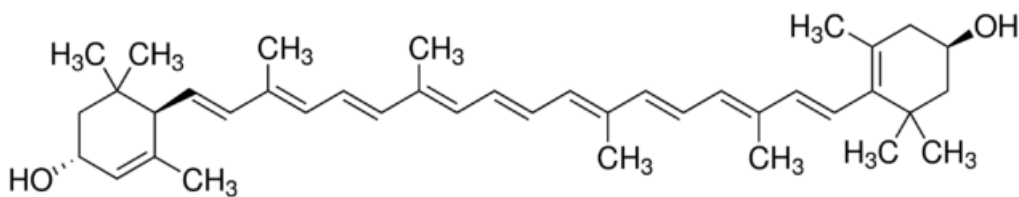


Figura 1. Estructura de la luteïna

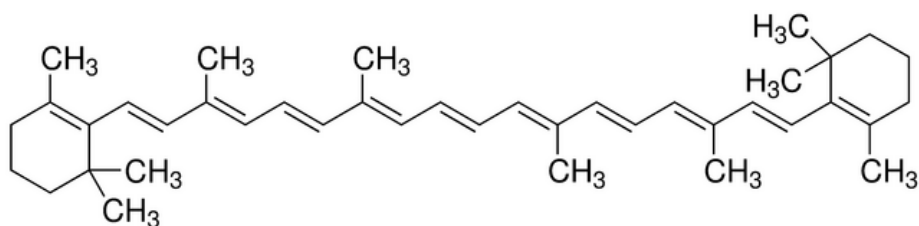


Figura 2. Estructura del beta-carotè

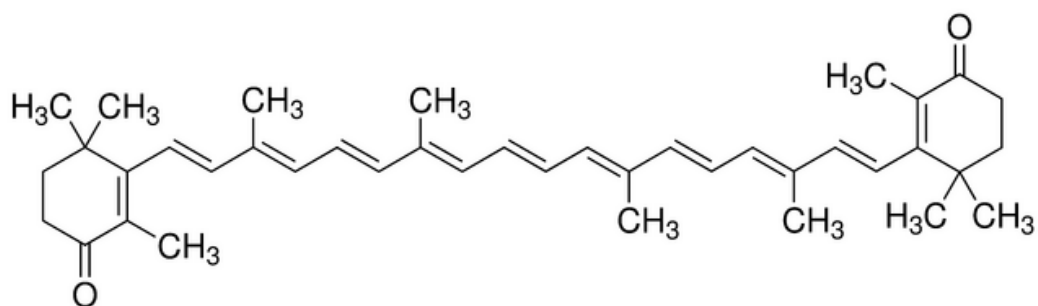


Figura 3. Estructura de la trans-cantaxantina

### **3. Fonaments**

#### **3.1 Cromatografia líquida**

Un bon mètode per determinar barreges d'un llarg nombre d'analits similars és la cromatografia. Aquesta dóna tant informació qualitativa com quantitativa, ja que cada component de la barreja té el seu propi temps d'elució donades unes determinades condicions i l'àrea i l'alçada dels pics cromatogràfics són proporcionals a la quantitat de substància.

La cromatografia és un procés de separació en el qual la barreja de la mostra es distribuïda en dues fases la estacionària i la mòbil.

La cromatografia emprada en aquest treball és una cromatografia de líquids amb detector UV-visible. La columna utilitzada és de fase normal.

La columna utilitzada tindrà una fase estacionària polar i la fase mòbil serà relativament apolar. La diferència de quant s'adsorbeixen els diferents analits de la mostra a la fase estacionària donarà la diferent separació.

Fase mòbil: si s'utilitza més d'un solvent han de ser miscibles l'un en l'altre i perquè hi hagi diferències majors en el patró d'elució han de tenir diferents propietats tant com sigui possible. El dissolvent habitual en les separacions de fase normal és l'hexà.

El detector que s'utilitza un detector DAD, Diode Array Detector, aquest detector permet obtenir i guardar espectres de cada pic cromatogràfic i treballar alhora en diferents longituds d'ona permetent així obtenir la màxima resposta de cada analit que es vulgui analitzar.[4]



Figura 4. Cromatògraf de líquids. HPLC

### **4. Part experimental**

#### **4.1 Mètode d'anàlisi**

El mètode d'anàlisi emprat per la determinació de cantaxantina i luteïna es basa en un mètode de la AOAC. El mètode prèviament emprat és igual al que es descriu a continuació però la determinació dels pigments es duia a terme amb l'espectrofotòmetre que donava els resultats de manera aproximada ja que tots els pigments absorbeixen a la zona del visible.

Es tritura el pinso fins que quedi una farina fina, hi ha pinsos que poden venir en forma de grans i altres que tot i ser com una farina convé triturar per garantir que totes les repliques siguin el més semblants possibles ja que en el pinso pot haver-hi trossos de blat de moro que contindrà t-luteïna i t-zeaxantina.

Es pesa la quantitat adient de pinso en un matràs aforat de 100 ml. S'afegeixen exactament 30 ml de solució d'HAET i es posa el matràs tapat a un bany d'ultrasons a temperatura ambient durant 5 minuts per extreure els carotenoides presents.

El següent pas dependrà de si s'ha de saponificar o no el pinso per analitzar. En cas de saponificar la mostra s'ha de fer amb 4 ml d'una solució de KOH metanòlic al 40%, que s'haurà d'addicionar a l'aforat, remoure lleugerament i deixar a les fosques durant 24 hores. Durant aquest temps s'ha de remoure lleugerament el matràs en intervals de temps. En cas de que no sigui necessari aquest pas es passarà directament al següent.

S'afegeixen exactament 30 ml d'hexà al matràs aforat i es remou lleugerament. Tot seguit s'afegeix solució de sulfat de sodi ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) al 10 % fins a l'entrà. Es sacseja fortament el matràs per tal de barreja bé les dues fases i es deixa a la foscor perquè es separin les dues fases, l'orgànica que contindrà els analits i l'aquosa. Els anàlisis es faran de la fase orgànica.

Si és necessari perquè la mostra no es separa fàcilment es centrifuga durant 5 minuts per tal d'acabar de separar les fases i per si hi ha alguna partícula de pinso es separi de la mostra que es punxarà al cromatògraf. La fase la qual s'agafa per analitzar ha de ser totalment transparent. [5]

El mètode HPLC per l'anàlisi ve donat a continuació, amb les condicions cromatogràfiques descrites a la taula 1. Com s'ha mencionat als fonaments s'utilitzarà fase normal.

Taula 1. Condicions cromatogràfiques

<b>Columna :</b>	De sílica
<b>Fase mòbil :</b>	Barreja de dissolvents orgànics
<b>Flux :</b>	1.7 ml/min
<b>Pressió :</b>	400 bars màxim
<b>Temperatura :</b>	Ambient
<b>Volum injectat :</b>	10-20 $\mu\text{l}$
<b>Detecció :</b>	DAD a 445nm, 450nm i 468 nm
<b>Temps d'anàlisi :</b>	16 minuts

La lectura de cada analit es farà a una longitud d'ona diferent, cada pigment es detectarà a la longitud d'ona on es troba el seu màxim. En el cas de que el pigment tingui més d'un màxim com és el cas de la t-luteïna i el beta-carotèes llegirà al de major intensitat. A la figura 5 es poden observar els espectres dels tres pigments, el beta-carotè, la t-luteïna i la t-cantaxantina.

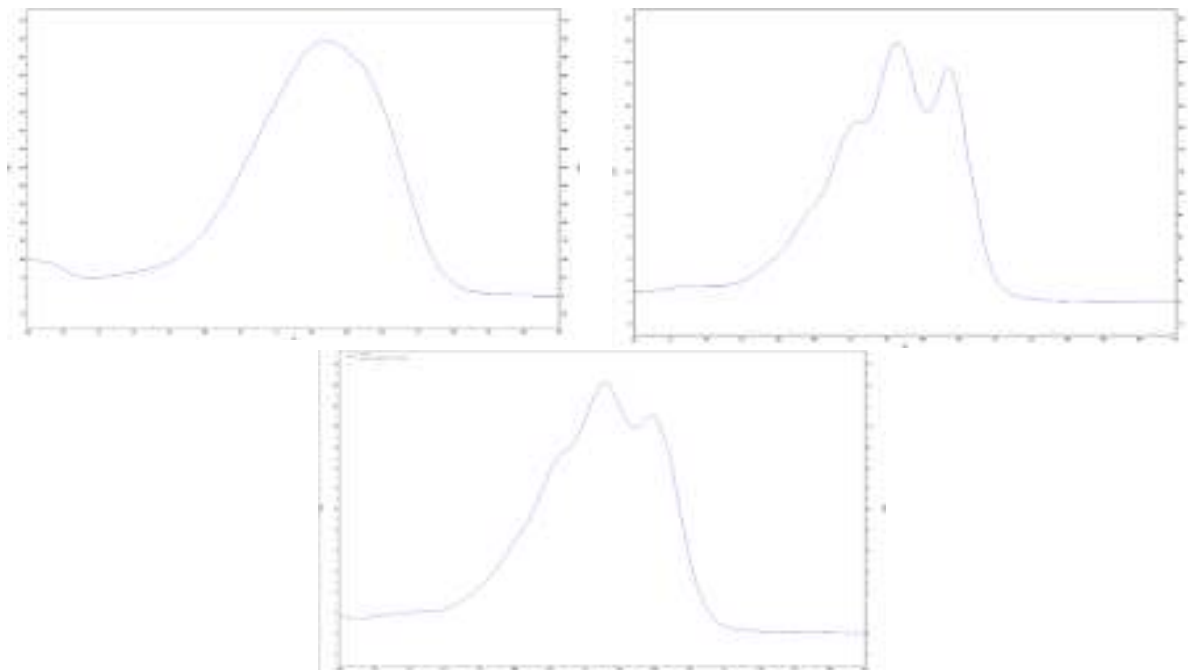


Figura 5. Espectres de la t-cantaxantina (a la part superior esquerra), la t-luteïna (a la part superior dreta) i el beta-carotè (a la part inferior)

Les longituds d'ona a les quals seran mesurats els analits seran de 445 nm per la t-luteïna, 450 pel beta-carotè i 468 nm per la t-cantaxantina, que són les longituds d'ona on es troben els seus màxims. Aquestes longituds es van trobar punxant dissolucions dels patrons de cadascun dels pigments i mirant el seu espectre a l'HPLC per veure on es trobaven els màxims de cadascun d'ells.

## 4.2 Optimització del mètode

En l'apartat anterior s'ha descrit el mètode que s'emprarà per analitzar el pinso. En els següents apartats s'expliquen algunes optimitzacions que es van dur a terme a l'hora de posar a punt el mètode i abans de començar a validar-lo.

### 4.2.1 Saponificació o no saponificació

A més dels pigments que s'afegeixen al pinso hi ha pigments presents en el mateix degut a les matèries primeres emprades en la fabricació d'aquest com podrien ser el moresc i altres. En el mètode d'extracció que s'utilitza a més d'extreure el pigment que s'afegeix al pinso també s'extreuen els pigments que ja estaven presents en ell. Es va voler determinar quina variació donava lloc si es saponificava el pinso, saponificant totes les xantofil·les presents, o només s'extreien les afegides amb una petita quantitat que vindrien del pinso.

Per fer aquesta determinació es va agafar pinso del qual es van determinar l'àrea/pes de la luteïna present en ell saponificant en un cas tal com diu el mètode i no saponificant. De cada experiència es van fer tres repeticions, per tal de determinar la desviació estàndard relativa dels anàlisis, % RSD, la fórmula de la qual està descrita a la figura 6. Es van pesar 10g de pinso. Els resultats obtinguts són els descrits a la taula 1.

$$\% RSD = 100 \times \frac{S}{\bar{x}}$$

Figura 6. Fórmula del %RSD

La S correspon a la desviació estàndard dels anàlisis i la  $\bar{x}$  la mitjana. [6]

Mostra analitzada: Poulet Etude

Taula 1. Resultats de la determinació de pigments en pinsodepenent de si hi ha o no una saponificacióprèvia

Tipus	nº	Pes (g)	Àrea/ Pes Luteïna	%RSD Luteïna
<b>Mostra no saponificada</b>	1	10.0064	46325	2.6
	2	9.9997	43981	
	3	10.0013	45096	
<b>Mostra saponificada</b>	1	10.0001	86360	3.3
	2	10.0016	83713	
	3	10.0027	80921	

En les dades mostrades a la taula anterior es pot observar com la quantitat de luteïna s'incrementa depenent de si saponifica la mostra o si aquesta no ho està. Per tant es saponificaran els pinsos per tal d'obtenir els resultats de luteïna total, la que s'ha afegit més la que ja venia del pinso. Com no es podrà només obtenir la luteïna afegida sinó que sempre també s'extraurà i es determinarà en l'anàlisi una petita part que es trobava present al pinso, si es vol saber només la quantitat afegida serà necessari analitzar el blanc del pinso, tot i que a vegades pot ser difícil si no es disposa d'aquest.

#### 4.2.2 Quantitat de pinso

El mètode deia que s'havien de pesar entre 5 i 10 g de pinso per la quantitat de pigments presents en ell. Per saber quina quantitat era millor es van fer anàlisis utilitzant diferents quantitats. Aquestes quantitats van ser 5, 10, 15 i 20g. S'ha de tenir en compte que com la quantitat afegida de pigments al pinso és molt petita interessa una quantitat inicial de mostra gran per tal de millorar

la sensibilitat, ja que llavors les àrees obtingudes a l'HPLC seran més grans. S'utilitza el mètode descrit anteriorment i el pinso es saponificarà. El pinso utilitzat serà el mateix que en l'apartat anterior i de cada determinació per cadascun dels pesos es faran 3 repeticions. A la taula següent es mostren els resultats de les determinacions.

Mostra utilitzada: Poulet Etude

Taula 2. Resultats de la determinació de luteïna canviant la quantitat de pinso pesada

Tipus d'assaig	nº	Pes (g)	Àrea/Pes Luteïna	Mitjana	% RSD Luteïna
<b>Mostra 5g</b>	1	5,0001	90818	91879	1,2
	2	5,0020	92983		
	3	5,0012	91836		
<b>Mostra 10g</b>	1	10,0001	86360	83665	3,3
	2	10,0016	83713		
	3	10,0027	80921		
<b>Mostra 15g</b>	1	15,0083	48938	51257	4,5
	2	15,0010	51257		
	3	15,0021	53575		
<b>Mostra 20g</b>	1	20,0024	46391	45709	7,1
	2	20,0001	42190		
	3	20,0021	48546		

Problemes observats: Com més gran era la mida de la mostra mesurada es va observar com l'ultrasons no era capaç de moure-la gaire i es quedava el pinso com una massa compacta al fons del matràs aforat i durant la saponificació també costava agitar, essent la de 20g la que més li costava arribant a passar que hi havia una part que es quedava compactada al fons del matràs.

S'observa per les dades mostrades a la taula anterior com a mesura que s'augmenta la mida de mostra disminueix també la relació àrea/pes de luteïna sent la disminució més pronunciada la de 10 a 15 g, tot i que ja es veu una lleugera disminució entre les mostres de 5 i 10g. Amb aquests resultats es pot dir que la quantitat que dona millors resultats és la de 5g. Això també es confirma veient els percentatges de la desviació estàndard relativa que en el cas que dona més baix, per tant millors, és la mostra de 5 g tot i que tampoc són tant dolents els de 10g. Els resultats que ja no serien acceptables per % RSD serien els de les mostres de 20g que com s'havia dit en el paràgraf anterior ja donava problemes a l'hora del seu anàlisi.

### 4.2.3 Temps de saponificació

Un cop es va determinar la quantitat a utilitzar en l'anàlisi de pinso es va mirar com variava el paràmetre àrea/pes de la t-luteïna depenent el temps estigui saponificant la mostra. En el mètode que es va utilitzar com a referència indicava que aquest temps havia de ser de 24 hores i agitant ocasionalment durant aquest període de temps. Es van fer un únic assaig per cadascun dels següents temps de saponificació: 0, 1, 3, 5, 7, 15, 18, 21 i 24 hores. Es poden observar els resultats obtinguts en el següent gràfic.

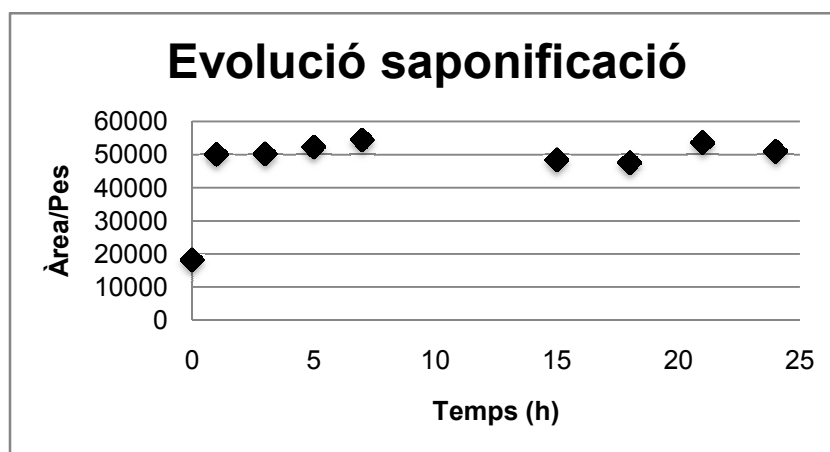


Figura 7. Evolució de l'àrea de la luteïna al llarg del temps de saponificació

En la figura anterior es pot observar com durant les primeres 7 hores l'àrea/pes dels pics cromatogràfics de la t-luteïna referents a les mostres analitzades augmenten, tot i que, el major augment en àrea/pes ocorre durant la primera hora. Un cop passen 7 hores es veu una disminució de l'àrea/pes de t-luteïna en les mostres que pertanyen al temps de 15 i 18 hores. Aquesta disminució pot ser deguda a que aquestes mostres no van ser agitada ocasionalment com les primeres degut a que s'havien de prepara al final d'una jornada de treball i van ser analitzades a començament del dia següent. S'observa també com el màxim es troba a les 21 hores i torna a baixar a les 24 hores. Com només es va fer una rèplica per cada tipus d'assaig el resultats que es donen no provenen d'unamitjana fent així que la variació que hi hauria si hagués rèpliques no s'aprecia degut a que només hi ha una rèplica.

Com es va observar que gran part de la saponificació ocorria durant el transcurs de la primera hora es va fer un assaig canviant lleugerament el mètode i fent que la saponificació es produís dins de l'ultrasons. Com s'utilitzaria l'ultrasons, un cop afegit l'HAET a la mostra se l'afegien també els 4 ml de KOH metanolic al 40% i es deixava a l'ultrasons durant el temps corresponent a cada assaig, l'única excepció és la de temps 0 minuts a la qual no s'afegeix KOH i si es fica a l'ultrasons els 5 minuts indicats pel mètode per extreure els pigments afegits al pinso. Es van fer dues repeticions de cada

assaig als temps: 0, 5, 10, 15, 30 i 60 minuts. Els resultats es poden observar en la següent figura.

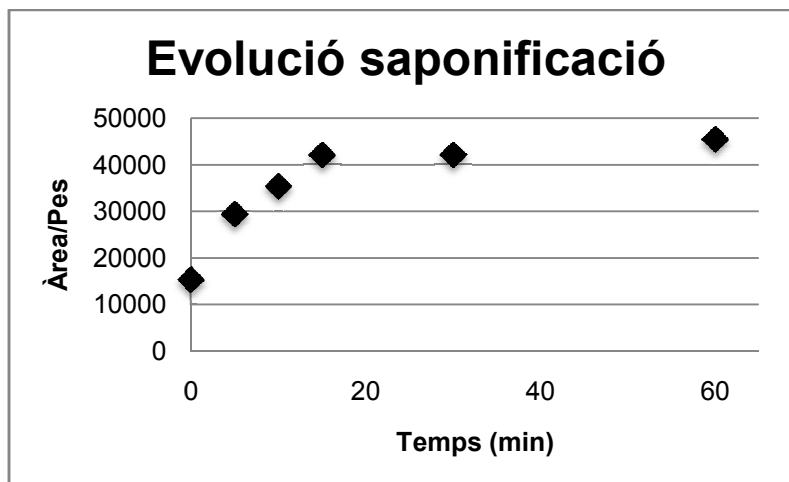


Figura 8. Evolució de les àrees/pes de la luteïna al llarg del temps de saponificació a l'ultrasons

Tal i com es pot observar a la figura anterior l'àrea/pes de la luteïna va augmentant a mesura que passa el temps tot i que es pot apreciar com als 15 minuts la saponificació ja està gairebé feta. Els problemes que poden succeir si es deixa una hora o més a l'ultrasons es que aquest s'escalfa quan l'assaig ha d'ocórrer a temperatura ambient.

### Comparació de mètodes

Donat els resultats previs es va fer una comparació de la saponificació descrita pel mètode amb la saponificació en 7 hores o en 30 minuts a l'ultrasons per veure si diferien significativament dels valors que s'obtidrien si es deixen les 24 hores que indica el mètode. Cal a dir que la temperatura augmenta d'ambient fins aproximadament 45°C en els 30 minuts que duraria la saponificació a l'ultrasons. Els que s'han deixat saponificar a la foscor durant hores se'ls ha afegit un iman i s'han agitat durant dos minuts cada hora durant el dia, la de 24 hores només durant les hores de treball del laboratori.

Taula 3. Resultat dels assajos

Tipus d'assaig	Pes (g)	Àrea/ Pes Luteïna	Mitjana	% RSD
30 minuts (ultrasons)	4,9983	43505	43171	0,7
	5,0050	42895		
	4,9983	43112		
7 hores	5,0091	43819	44450	1,6
	5,0020	44283		
	5,0017	45248		
24 hores	5,0132	49286	50985	4,0
	5,0087	53223		
	8,0056	50445		

Un cop es van obtenir els resultats anteriors es va dur a terme un test estadístic per veure si els resultats de les variacions que s'aplicaven al mètode eren estadísticament diferents. Si els resultats no diferien significativament voldria dir que es podrien analitzar les mostres aplicant el canvi produït sense que canviessin els resultats. Per analitzar els resultats es va fer un test t per comparar les dues mitjanes, la de la modificació que es volia aplicar i la mitjana del resultat de la mostra si s'utilitza el mètode descrit. Es pot apreciar una disminució de l'àrea/pes entre la saponificació tal com indica el mètode i la saponificació a l'ultrasons o en menor temps.

Per saber quina fórmula s'ha d'utilitzar a l'hora d'aplicar el test t primer es va mirar si les variàncies de les mitjanes eren comparables amb la següent expressió:

$$F_{\text{cal}} = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

Figura 9. Expressió per calcular la F de Fisher de la comparació de variàncies de dues mitjanes

S'ha de tenir en compte que el valor que se li dona l'etiqueta de 1 és el corresponent al valor major de variància de tots dos ja que el valor de la F calculada sempre haurà de tenir un valor major a 1. Els valors que s'han trobat venen indicats a la taula 4.[7]

Taula 4. Càlcul de la F calculada

Comparació 30 min i 24h		Comparació 7h i 24h	
$s_1^2$	4092744	$s_1^2$	4092744
$s_2^2$	95638	$s_2^2$	531201
$F_{\text{cal}}$	<b>42,79</b>	$F_{\text{cal}}$	<b>7,70</b>

La  $F_{\text{tab}}$  per una  $\alpha=0,05$  i per 2 i 2 graus de llibertat és de 19 [8], fent que les mitjanes de 30minuts i 24 hores no siguin comparables ja que la F tabulada és menor que la calculada i les mitjanes de 7 i 24 hores si són comparables. Les fórmules per saber la t venen donades en la següent figura, la que es troba a l'esquerra correspon a quan les mitjanes són comparables ( $F_{\text{cal}} < F_{\text{tab}}$ ) i la de la dreta quan no ho són ( $F_{\text{cal}} > F_{\text{tab}}$ ).

$F_{\text{cal}} < F_{\text{tab}}$ $t_{\text{cal}} = \frac{ \bar{x}_1 - \bar{x}_2 }{\sqrt{s_p^2 \left( \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$ $s_p^2 = \frac{(n_1 - 1) \cdot s_1^2 + (n_2 - 1) \cdot s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$	$F_{\text{cal}} > F_{\text{tab}}$ $t_{\text{cal}} = \frac{ \bar{x}_1 - \bar{x}_2 }{\sqrt{\left( \frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2} \right)}}$ $v = \frac{\left( \frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2} \right)^2}{\frac{s_1^4}{n_1^2 \cdot (n_1 - 1)} + \frac{s_2^4}{n_2^2 \cdot (n_2 - 1)}}$
--	---

Figura 10. Fórmules pel càlcul de la t calculada segons els resultats donats del test F [12]

Utilitzant les expressions que apareixen a la figura anterior es van obtenir els resultats que es poden observar a la taula 5.

Taula 5. Càlcul de la t calculada

Comparació 30 min i 7h		Comparació 7h i 24h	
<b>v=gl</b>	2,70	<b>s<sub>p</sub><sup>2</sup></b>	2311972
<b>t<sub>cal</sub></b>	6,61	<b>t<sub>cal</sub></b>	5,26
<b>t<sub>tab</sub>(α=0.05;3)[8]</b>	2,35	<b>t<sub>tab</sub>(α=0.05;4)[8]</b>	2,13

En tots dos casos la t calculada és major que la tabulada fent així que els mètodes no siguin comparables, i per tant, la saponificació s'haurà de dur a terme en 24 hores tal com s'indica en el mètode.

#### 4.2.4 Desencapsulació de la cantaxantina

El pigment de cantaxantina que s'utilitza per afegir al pinso a Novus és un pigment recobert el qual s'haurà de desencapsular per poder mesurar la cantaxantina que hi hagi present. En el mètode d'anàlisi de cantaxantina la desencapsulació es duu a terme amb 1 ml de KOH aquós i ficant-ho al ultrasons durant 25 minuts a 55°C. Com per saponificar les xantofil·les del pinso s'utilitza KOH metanòlic al 40% es va pensar que amb els 4 ml que s'afegien per dur a terme la saponificació també es podia donar la desencapsulació de la cantaxantina, però com és necessària la presència d'aigua es va afegir 1 ml d'aigua. També es va fer un assaig amb KOH aquós però el temps a l'ultrasons només són 10 minuts perquè es va observar que en aquest temps la mostra podia ja estar desencapsulada. Els resultats obtinguts són els següents.

Taula 6. Resultats dels assajos de la comparació de mètodes de la desencapsulació de la cantaxantina

Tipus d'assaig	Pes (mg)	Àrea/Pes cantaxantina	Mitjana	% RSD
KOH aquós (25 min)	29.3	566159	577013	1,95
	29.8	576298		
	30.2	588582		
KOH metanòlic	30.2	577201	580799	1,59
	30.0	591318		
	31.1	573878		
KOH aquós (10 min)	30.4	582357	573612	2,00
	29.9	577837		
	30.2	560642		

Per saber si els mètodes són comparables es va fer un anàlisi de comparació de les mitjanes tal com es va explicar en l'apartat anterior.

Taula 7. Càlcul de la F calculada

Comparació KOH aquós 25 min i KOH metanòlic		Comparació KOH aquós 25 min i 10 min	
$s_1^2$	126081457	$s_1^2$	131272713
$s_2^2$	85746424	$s_2^2$	126081457
$F_{cal}$	<b>1,47</b>	$F_{cal}$	<b>1,04</b>

Com tots dos valors de F calculada són menors a la F tabulada, que té un valor de 19[8], s'utilitzarà l'expressió de l'esquerra de la figura 10.

Taula 8. Càlcul de la t calculada

Comparació KOH aquós 25 min i KOH metanòlic		Comparació KOH aquós 25 min i 10 min	
$s_p^2$	105913940	$s_p^2$	128677085
$t_{cal}$	0,45	$t_{cal}$	0,37
$t_{tab}(\alpha=0.05;2)[8]$	2,13	$t_{tab}(\alpha=0.05;2)[8]$	2,13

En tots dos casos el mètode serà comparable, pertant som s'utilitzarà el KOH metanòlic per la saponificació de les xantofil·les del pinso s'afegirà 1 ml d'aigua i així també servirà per la desencapsulació de la cantaxantina i no serà necessària la preparació i utilització del KOH aquós al 10%. [7]

### 4.3 Factor de resposta

La concentració de cada pigment que conté el pinso es determinarà mitjançant la utilització d'un factor que relaciona les intensitats dels pics cromatogràfics entre el pigment d'interès i el beta-carotè que serà el pigment la recta del qual serà utilitzada per trobar la concentració el la mostra. Un cop es trobi la concentració del pigment utilitzant la recta del beta-carotè, mitjançant la utilització del factor de resposta es trobarà la concentració del pigment en la mostra analitzada. Aquest procediment de determinació dels pigments a partir de la recta de calibratge del beta-caroté serà necessari degut a l'alt cost que tenen els estàndards de la resta de carotenoides que serien necessaris si s'utilitzés per la determinació de cada pigment la seva pròpia recta. D'aquesta manera només caldrà fer les rectes de cada pigment una vegada i la que s'anirà validant cada cert temps, per veure si el mètode segueix sent vàlid, serà la del beta-carotè que serà el pigment de menor cost. La fórmula per trobar el factor de resposta que relaciona els diferents pigments ve descrita a la figura 11 i es basa en la relació de les pendents de les dues rectes, la recta del pigment d'interès i la recta del beta-carotè. [9]

$$\text{Factor de resposta} = \frac{\text{pendent}_{\text{carotenoides}}}{\text{pendent}_{\text{beta-caroté}}}$$

Figura 11. Fórmula per al càlcul del factor de resposta

Un cop es troben els diferents factors de resposta a través de la relació de pendents, per calcular la quantitat de pigment que conté la mostra i la concentració de carotenoides totals que conté es farà a partir de la fórmula de la figura 12.

$$\text{ppm}_{\text{carotenoides}} = \frac{c_p \times d}{\text{factor de resposta} \times \text{pes}}$$

Figura 12. Fórmula per al càlcul del ppm de cada carenoide

$c_p$ : és la concentració de carenoide calculada a partir de la recta del beta-carotè per cadascun dels pics cromatogràfics de la mostra.

$d$ : dilucions que s'han fet a la mostra

pes: pes inicial de mostra

## 4.4 Preparació de les rectes patrons

### 4.4.1 Anàlisi dels patrons a utilitzar

Per fer la recta de calibratge es van utilitzar un patró de beta-carotè, t-luteïna amb t-zeaxantina purificada i t-cantaxantina purificada.

Abans de fer les diferents rectes de calibratge es va dur a terme un anàlisi per determinar la quantitat de cantaxantina que hi havia al patró i la quantitat de luteïna que tenia la luteïna purificada. La puresa del patró de beta-carotè ve donada per el certificat d'anàlisi. Per garantir la mínima pèrdua de concentració o puresa dels diferents patrons degut a la degradació que poden patir en el temps, aquests estaven emmagatzemats al congelador.

Per fer aquest anàlisi es va emprar un mètode basat en el AOAC per a la determinació de xantofil·les totals i cantaxantina o luteïna que hi havia establert pel laboratori i es va determinar la quantitat que n'hi havia.

Els reactius utilitzats per aquesta determinació van ser:

-Diclorometà PRS

-Ciclohexà PRS

-Etanol PRS

### **Mètode d'anàlisi**

-Pesar 50 mg del producte en pols un matràs aforat de 100 ml, dissoldre amb 10 ml diclorometà i enrasar amb ciclohexà. Es fan tres repeticions de cada producte. D'aquesta solució:

-Pipetejar 5 ml i enrasar a 100 ml (solució intermèdia). Aquesta solució és la qual es punxarà a l'HPLC.

-De la solució intermèdia pipetejar 5 ml i enrasar amb ciclohexà si es tracta de la cantaxantina i amb etanol si és la luteïna. Es determinen les xantofil·les totals amb les següents dades a l'espectrofotòmetre. [10]

Taula 9. Coeficients d'extinció teòrics de la luteïna i la cantaxantina segons el dissolvent emprat [11]

<b>Analit</b>	<b><math>\lambda</math>(nm)</b>	<b>Dissolvent</b>	<b>Coefficient d'extinció</b>
<b>Luteïna</b>	445	etanol	2550
<b>Cantaxantina</b>	470	ciclohexà	2200

Taula 10. Xantofil·lestotals de la luteïna i cantaxantina purificades

Patró	Pes (g)	Absorbància	Xantofil·les totals (mg/g)
Luteïna	0,0503	0,962	<b>750,0</b>
	0,0507	0,971	<b>751,1</b>
	0,0495	0,939	<b>743,9</b>
Cantaxantina	0,0500	0,5215	<b>948,2</b>
	0,0510	0,5245	<b>934,9</b>
	0,0522	0,5276	<b>918,8</b>

El mètode de l'HPLC emprat és el descrit pel mètode. També s'ha mirat amb el mètode que es vol implementar on sortiria el pic de la cantaxantina ja que s'utilitzarà un mètode on s'utilitza una fase mòbil diferent. En el cas de la luteïna es mirarà on té els seus màxims igual que en el cas de la cantaxantina.

La concentració en luteïna i cantaxantina són les mostrades en la següent taula:

Taula 11. Concentració de luteïna i cantaxantina i %RSD

Patró	Carotenoides	Mitjana	% RSD
Luteïna	688,2	687,4	<b>0,5</b>
	690,1		
	684,0		
Cantaxantina	884,4	870,3	<b>1,8</b>
	873,5		
	858,0		

Els resultats que han donat els anàlisis tenen una bona RSD i seran les concentracions que es donaran al patrons.

#### 4.4.2 Preparació de la recta de calibratge

##### **Reactius**

HAET: barreja d'hexà, acetona, etanol i toluè.

Hexà qualitat d' HPLC

Patró

### Preparació de solucions mare

- Pesar 20 mg de patró o producte purificat (en el cas de la cantaxantina) i 15 mg en el cas de la luteïna en un matràs aforat de 100 ml i afegir 30 ml de HAET.
- Deixar al bany d'ultrasons durant 5 minuts a 40 °C.
- Afegir 30 ml d'hexà i enrasar amb sulfat sòdic aquós al 10%. Agitar bé.
- Deixar a la foscor fins que es separin bé les dues fases.
- Punxar a l'HPLC la quantitat adient de la fase orgànica, aquesta quantitat vindrà donada per l'àrea que doni cada concentració a l'HPLC, que ha de ser fàcilment integrada. [9]

#### 4.4.3 Recta de la t-luteïna

Per saber l'interval de concentracions que serà necessari per establir la recta de calibratge d'aquest pigment es van fer càlculs per determinar l'extrem superior de la recta sabent quina és la concentració màxima esperada en pinsos i la quantitat pesada d'aquest per fer la determinació.

La concentració màxima seria de 100 ppm.

$$5 \text{ g pinso} \times \frac{100 \mu\text{g luteïna}}{1 \text{ g pinso}} \times \frac{1}{0.05\text{l}} \times \frac{1 \text{ mg luteïna}}{1000 \mu\text{g luteïna}} = 10 \text{ mg/l luteïna}$$

Com la concentració màxima i extrem superior seria de 10 mg/l. L'extrem inferior seria per una concentració de luteïna d'1 ppm en pinso, fent els mateixos càlculs que anteriorment aquesta concentració a la recta correspondria a 0,1 mg/l.

Es prepararan tres solució mare de t-luteïna com s'indica anteriorment i d'aquesta es prepararan dues solucions intermèdies de cadascuna d'elles. A partir d'aquestes intermèdies es prepararà la bateria de patrons. Com l'interval de concentracions de la recta es tan gran es va decidir fer dues rectes, una per baixes concentracions i una per concentracions majors. Per establir la recta es preparen 3 solucions mare de concentració el més semblant possible per fer 3 repeticions de cada punt de la recta. Les dues solucions intermèdies es van preparar pipetejant per una 5 ml i per l'altre 10 ml de solució mare i es van enrasar amb hexà en matrassos de 50 ml. Les dilucions i concentracions dels patrons si es pesessin 15 mg de t-luteïna venen donades a les següents taules, A la taula 12 es mostren les concentracions de la recta de menor concentració i a la taula 15 la de major concentració. Els patrons que formen les rectes vindran de diferents mares per minimitzar l'error analític.

Taula 12. Dilucions i concentracions dels patrons de la recta de menor concentració

Patró	Volum pipetejat (ml)	Volum aforat (ml)	Concentració (mg/l)
1	0,25	50	0,10
2	0,7	50	0,29
3	0,3	10	0,62
4	0,5	10	1,03
5	0,7	10	1,44
6	0,85	10	1,75

Un cop es tenen les solucions patró, cadascuna d'elles es va punxar a l'HPLC utilitzant les condicions descrites a la taula 1 i es va llegir l'àrea del pic de la luteïna que surt a un temps de retenció d'aproximadament 7 minuts a 445 nm que és la longitud d'ona on es troba un dels seus màxims. Els cromatogrames obtinguts de les solucions patrons són com el de la figura 10.

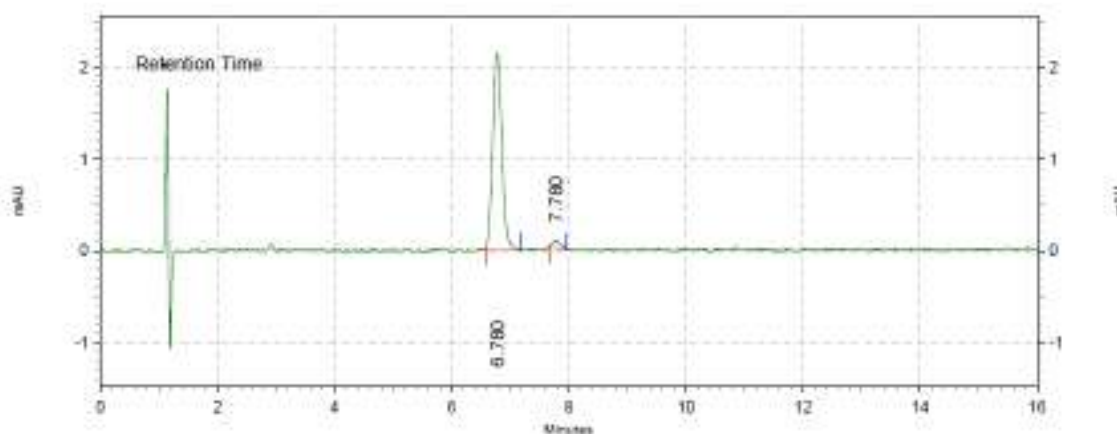


Figura 13. Cromatograma del patró 2

En la figura anterior es mostra el cromatograma d'un patró de t-luteïna. El primer pic que s'observa a un temps de retenció aproximat de 1 minut correspon al pic de fase, el pic degut al dissolvent de la solució patró que es una mescla d'hexà i HAET. El pic més important es troba a un temps de retenció de 6,780 min i correspon al pic de la t-luteïna, també es pot observar un pic a 7,780 min que correspon al seu isòmer la t-zeaxantina que es trobava present en el patró.

Un cop que s'obtenen totes les àrees dels pics cromatogràfics dels diferents patrons es construeix la recta de calibratge que pot ser observada a la figura 14.

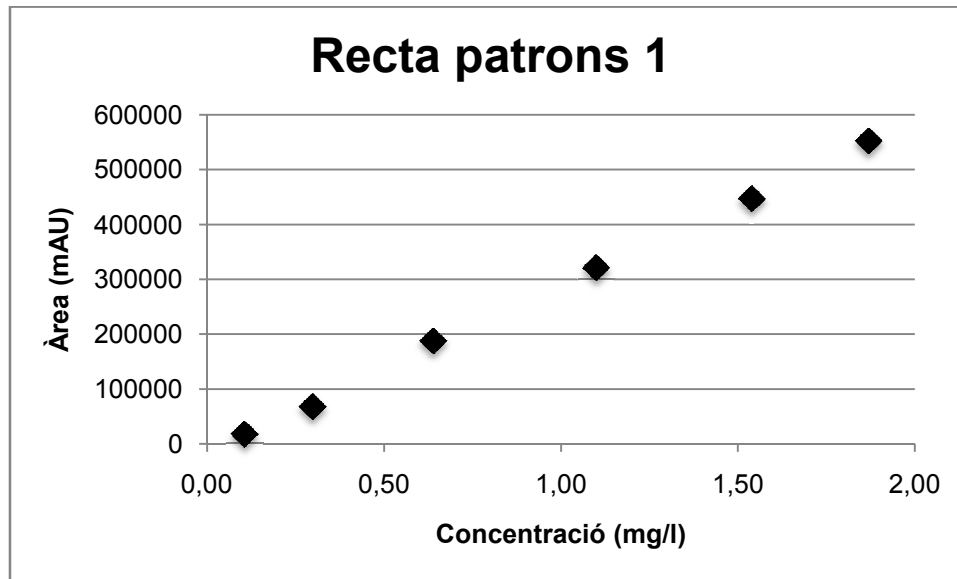


Figura 14. Recta de calibratge de la t-luteïna

Aquests valors s'ajustarà per el mètode de mínims quadrats a un model de línia recta per poder obtenir la pendent i l'ordenada a l'origen. Un paràmetre que indicarà l'ajust dels valors al model de línia recta serà el coeficient de correlació. Com més s'acostin els valors a 1 més s'ajustaran a la recta establerta pel model. La pendent, ordenada a l'origen i coeficient de correlació establerts per la recta venen descrits a la taula 13.

Taula 13. Paràmetres de la recta

Pendent	Ordenada a l'origen	Coefficient de correlació
303430	-15829	0.999

El coeficient de correlació és de 0,999 que indica un bon ajust dels valors a la recta. Tot i aquest coeficient per validar la recta també és necessari mirar els valors dels residuals per veure si tot i que hi hagi un bon ajust dels valors a la línia recta s'observa en aquests algun tipus de tendència.

Els residuals mostren la variació entre el valor experimental que s'obté de la determinació de cada patró de la recta i el valor de resposta que li correspondria a la recta ajustada. Aquests residuals venen donats per la fórmula indicada a continuació.

$$e_i = y_i - \hat{y}_i$$

Figura 15. Fórmula per al càlcul dels residuals

En la fórmula anterior,  $e_i$  és el valor del residual,  $y_i$  el valor trobat experimental i  $\hat{y}_i$  el valor que correspondria de la recta per cada concentració de patró. A la figura 16 es pot observar el gràfic de residuals de la recta 1 de la t-luteïna.

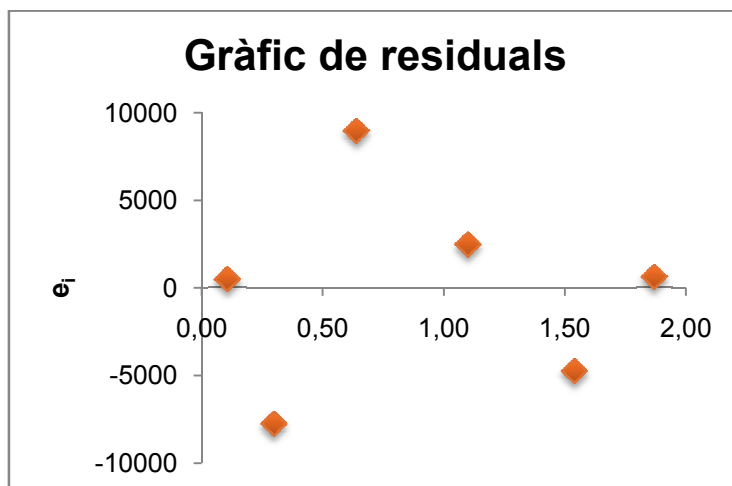


Figura 16. Gràfic de residuals de la t-luteïna

En el gràfic de la figura anterior es pot observar com els residuals no segueixen cap tendència, mostrant una aleatorietat en tot el gràfic i hi ha aproximadament el mateix nombre de residuals negatius que positius mostrant així que els valors de la recta s'ajusten a un model de línia recta. [13]

Un paràmetre per a la validació de la recta que ve fixat per l'empresa es a l'hora de dur a terme la calibració es que el valor de la  $y$  experimental ha d'estar comprès entre el 90 i 110 % del valor donat per la recta de calibratge. Si aquest quocient estretots dos valors és superior o inferior a algun dels dos límits es considerarà per aquella concentració si es calculés amb aquella recta es faria un error de determinació massa gran.

Taula 14. Resultat de  $y_i$  i  $\hat{y}_i$  de la recta per cada patró

$x_i$	$y_i$	$\hat{y}_i$	
0,11	16989	16502	<b>103%</b>
0,30	66932	74698	<b>90%</b>
0,64	187113	178158	<b>105%</b>
1,10	320375	317912	<b>101%</b>
1,54	446648	451408	<b>99%</b>
1,87	552152	551531	<b>100%</b>

Com es pot observar a la taula anterior cap dels valors es inferior al 90 % o superior al 110% validant així la recta de la luteïna.

La recta feta anteriorment corresponia a la recta entre les concentracions de 1 a 19 ppm. A continuació es mostra la segona recta la corresponent a concentracions majors. Aquesta recta haurà d'anar d'aquesta concentració fins als 100 ppm que s'havia dit prèviament que hauria de ser l'extrem superior de la recta.

Com en la recta anterior la taula 15 mostra les concentracions aproximades dels patrons si es pesen exactament 15 mg de patró.

Taula 15. Dilucions i concentracions dels patrons de la recta de major concentració

Patró	Volum pipetejat (ml)	Volum aforat (ml)	Concentració (mg/l)
1	1	10	2,06
2	0,8	10	3,30
3	1	10	4,12
4	15	50	6,19
5	10	50	8,25
6	15	50	12,37

Els cromatogrames obtinguts dels patrons analitzats són com el següent:

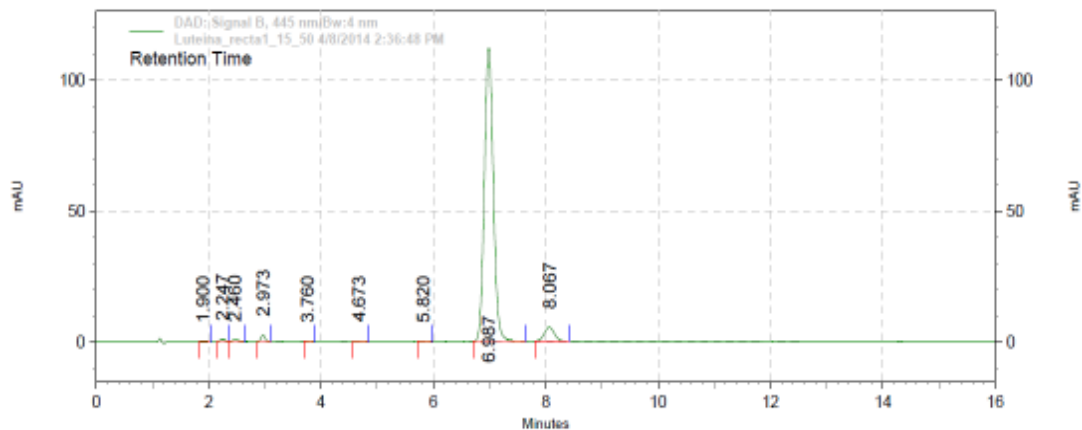


Figura 17. Cromatograma del patró 5 de t-luteïna

En la figura anterior es mostra el cromatograma d'un patró de t-luteïna. Es poden observar més pics que en els cromatogrames dels patrons a menors concentracions tot i que aquests pics no són integrables. El pic més important i que es mostra amb major intensitat correspon al pic de la t-luteïna que com s'ha mencionat anteriorment el seu temps de retenció és d'aproximadament 7 minuts. Un cop que s'obtenen les àrees dels pics cromatogràfics corresponents a la t-luteïna dels diferents patrons es construeix la recta de calibratge que es pot observar en la figura 18.

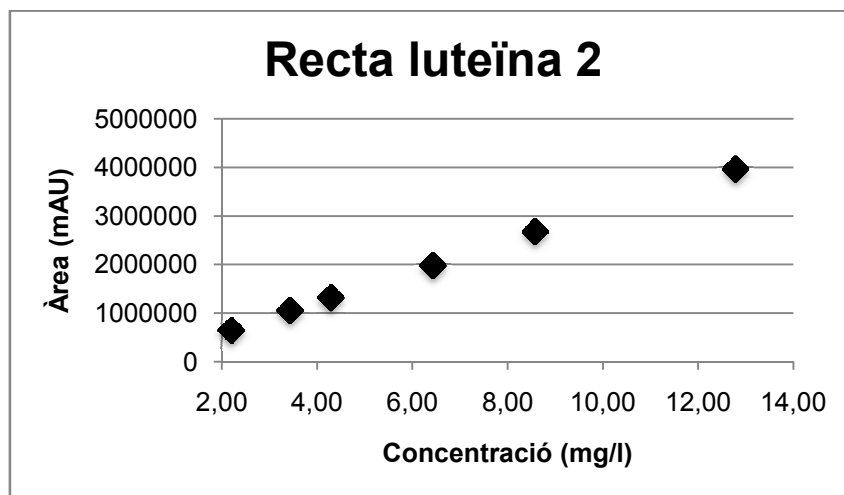


Figura 18. Recta 2 de t-luteïna

Un cop que es té la recta per validar-la es miren el coeficient de correlació per veure si els valors s'ajusten al model de línia recta i es miren els residuals.

Taula 16. Paràmetres de la recta

Pendent	Ordenada a l'origen	Coefficient de correlació
313020	-26523	0.999

El coeficient de correlació obtingut de l'ajust dels valors experimental a una recta per el mètode de mínims quadrats és molt proper a 1 indicant un bon ajust dels valors al model.

Com s'ha mencionat prèviament també es calcularan els residuals de cada valor a partir de la fórmula de la figura 14.

A la figura 19 es pot observar el gràfic dels residuals obtingut dels diferents valors.

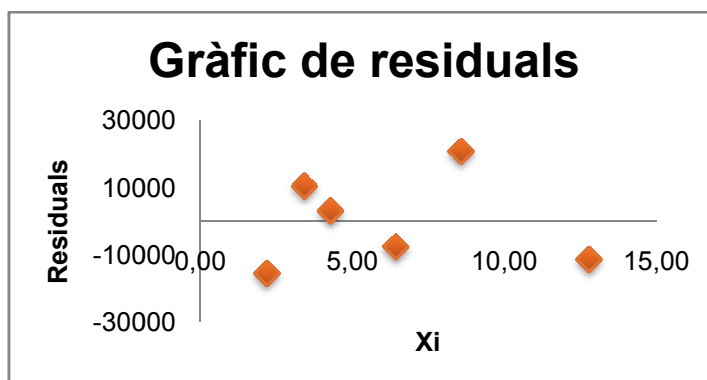


Figura 19. Residuals de la recta 2 de t-luteïna

En el gràfic de la figura anterior es pot observar com els residuals no segueixen cap tendència i estan repartits aleatòriament així ajustant-se els valors al un model de línia recta. [13]

Com s'ha dit prèviament el valor de la  $y$  experimental ha d'estar compres entre el 90 i 110 % del valor  $y$  donat per la recta de calibratge.

Taula 17. Resultat de  $y_i$  i  $\hat{y}_i$  de la recta per cada patró

$x_i$	$y_i$	$\hat{y}_i$	
2,20	648134	662055,8	<b>98%</b>
3,43	1070248	1047660	<b>102%</b>
4,29	1321760	1316205	<b>100%</b>
6,43	1953392	1987569	<b>98%</b>
8,58	2684123	2658934	<b>101%</b>
12,79	3970607	3975840	<b>100%</b>

#### 4.4.4 Cantaxantina

Per saber l'interval de concentracions necessari per aquest pigment es van realitzar càlculs per determinar l'extrem superior de la recta sabent quina és la concentració màxima esperada en pinsos i la quantitat pesada d'aquest per fer la determinació.

La concentració màxima seria de 3 ppm.

$$5g_{pinso} \times \frac{3\mu g_{cantaxantina}}{1g_{pinso}} \times \frac{1}{0.05l} \times \frac{1mg_{cantaxantina}}{1000\mu g_{cantaxantina}} = 0.3 \text{ mg/l}_{cantaxantina}$$

Com la concentració màxima seria de 0,3 mg/l l'extrem superior de la recta serà 1,75 mg/l.

Es va fer una dissolució mare tal i com s'indica anteriorment pesant aproximadament 0.02 g de patró de cantaxantina i d'aquesta dissolució mare es preparen 3 dissolucions intermèdies, diluint 5 ml de solució mare en 100 ml d'hexà i a partir de cadascuna d'elles 6 patrons de tal manera que cada punt de la recta vingui donat per cadascun dels tres patrons d'igual concentració provinents de la solució mare. Les dilucions i concentracions esperades dels patrons són les indicades per la següent taula.

Taula 18. Dilucions i concentracions dels patrons de cantaxantina

Patró	Volum pipetejat (ml)	Volum enrassat (ml)	Concentració (mg/l)
<b>1</b>	0,3	50	0,10
<b>2</b>	0,7	50	0,24
<b>3</b>	0,25	10	0,44
<b>4</b>	0,4	10	0,70
<b>5</b>	0,7	10	1,22
<b>6</b>	0,9	10	1,57

En l'anàlisi de patrons de cantaxantina s'obtenen cromatogrames com el següent:

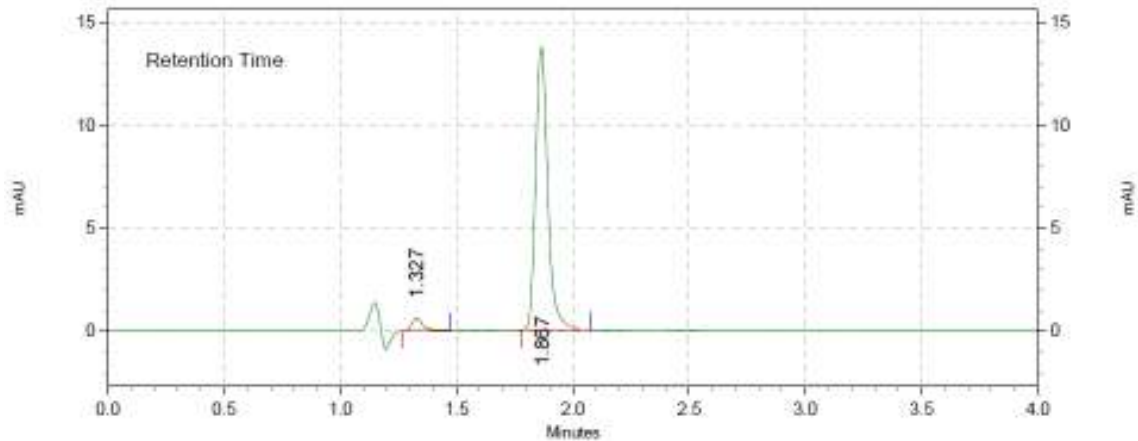


Figura 20. Cromatograma del patró 3 de cantaxantina

A partir de les àrees de cada analit es va poder construir la recta que es mostra en el següent gràfic.

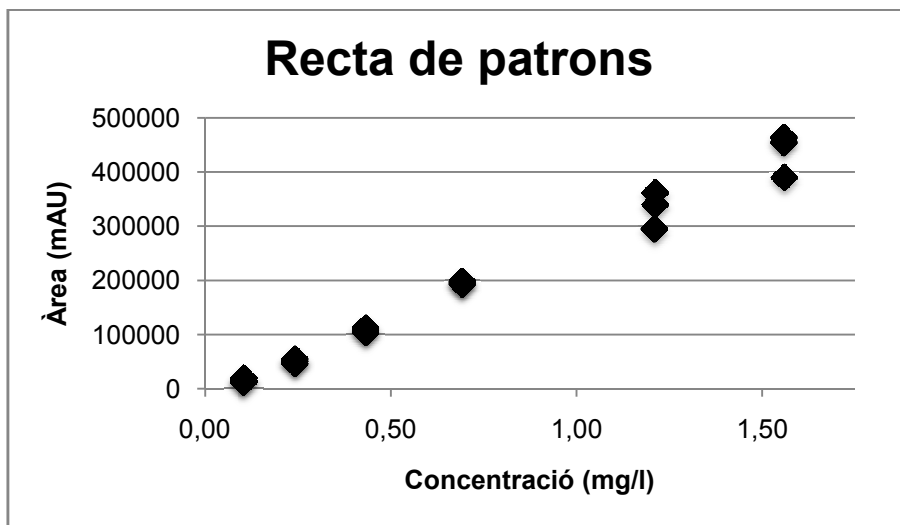


Figura 21. Recta patrons de la cantaxantina

Com es pot observar en la figura anterior hi ha punts de la recta que apareixen una mica dispersos. Per veure la bondat de la recta es va fer un gràfic de residuals per detectar possibles outliers. El gràfic de residuals es mostra a la figura 22.

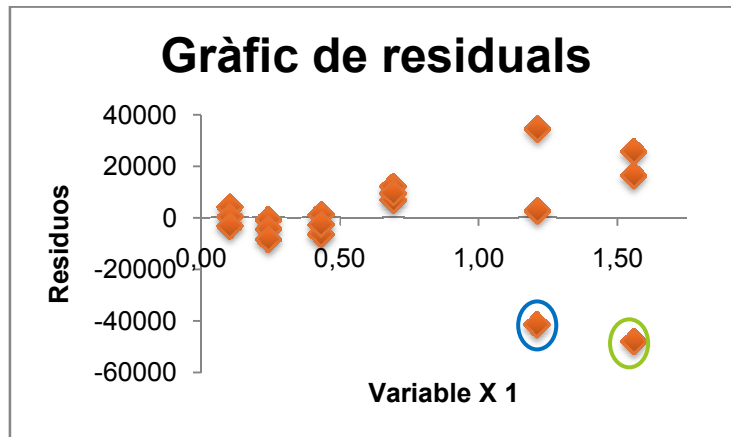


Figura 22. Gràfic de residuals de la recta de la cantaxantina

En aquest gràfic de residuals es pot observar com els punts encerclats difereixen significativament dels altres això pot indicar que són outliers. Per dir si ho són es va fer un test de la distància de Cook. [13]

Taula 19. Resultats del test de la distància de Cook

	Tots els punts	Traient el verd	Traient el blau
<b>Pendent</b>	289598	300556	313284
<b>Ordenada a l'origen</b>	-14854	-18790	-20902
<b>Distància de Cook</b>		<b>1.01</b>	<b>5.78</b>

Segons la distància de Cook els dos punts són outliers. El nou gràfic de residuals és el mostrat a la figura següent.

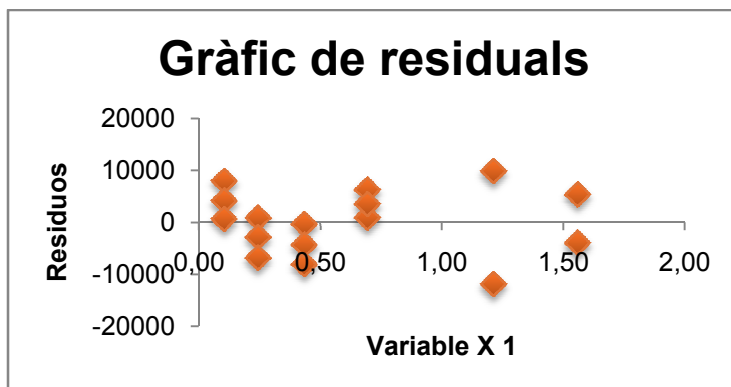


Figura 23. Gràfic de residuals eliminant outliers

Es pot observar en el gràfic com els valors del gràfic de residuals estan distribuïts de forma aleatòria, donant així l'aparença de que no hi ha cap tipus de tendència. Per validar la recta es va fer una ANOVA de regressió. [14]

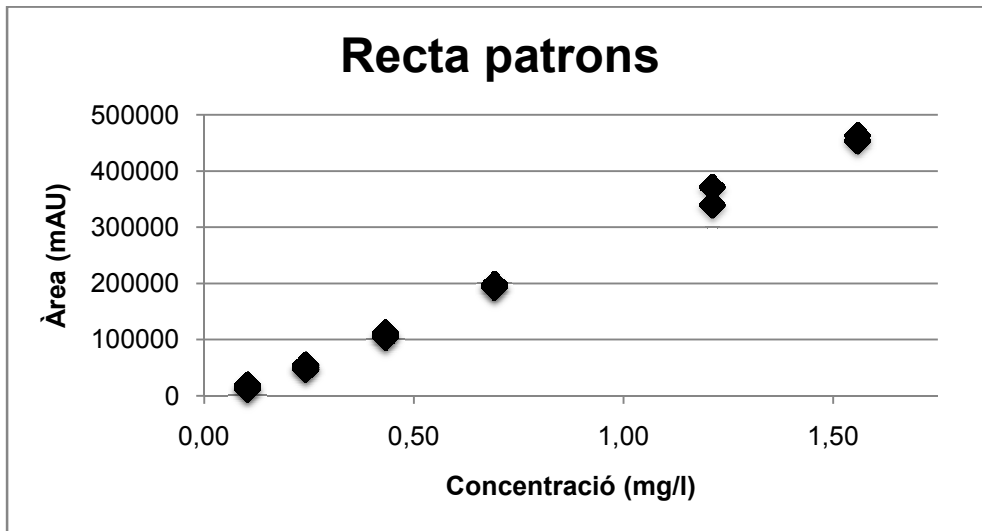


Figura 24. Recta de calibratgedel patrons de cantaxantina

Un cop s'ha tret els outliers es determinen els paràmetres de la recta, que venen donats a la taula següent.

Taula 20. Paràmetres de la recta

Pendent	Ordenada a l'origen	Coefficient de correlació
308315	-19842	0.998

El coeficient de correlació indica que els valors s'ajusten bé al model de línia recta.

Les fórmules per fer l'ANOVA es mostren a la figura següent.

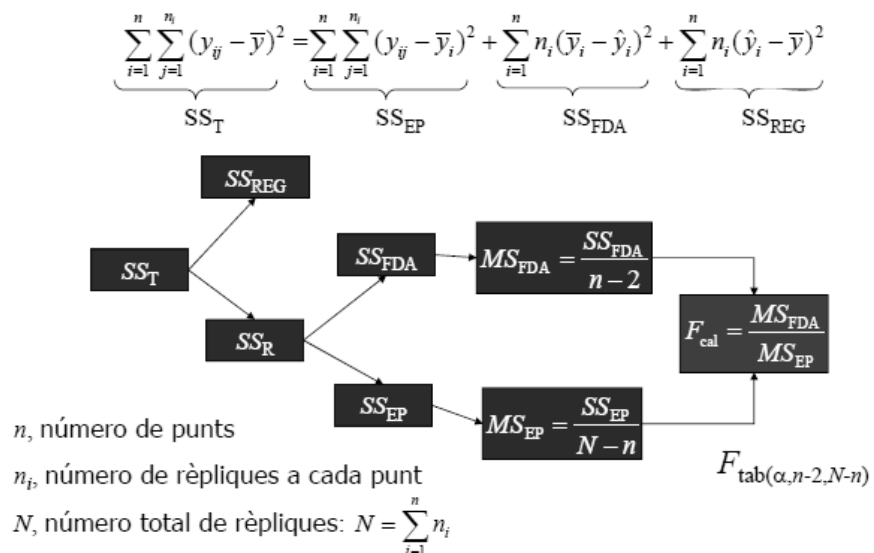


Figura 25. Fórmules de l'ANOVA de regressió [14]

Taula 21. Paràmetres per dur a terme l'anàlisi d'ANOVA

$x_i$	$\bar{y}_i$	$(y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$(\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2$	$n_i$
<b>0,10</b>	15698	13853284	12139721	3
		7140		
		13231406		
<b>0,24</b>	51044	14478871	15100435	3
		11224		
		15296356		
<b>0,43</b>	111622	111957561	4175635	3
		51337225		
		11669056		
<b>0,69</b>	195931	7320632	4718000	3
		7184188		
		642		
<b>1,21</b>	355963	252539772	4062890	2
		252539772		
<b>1,56</b>	459133	21776222	2579470	2
		21776222		

Taula 22. Resultats de l'ANOVA de regressió

<b>SS<sub>FDA</sub></b>	188.696.723
<b>SS<sub>EP</sub></b>	650.026.239
<b>MS<sub>FDA</sub></b>	471.741.181
<b>MS<sub>EP</sub></b>	65002624
<b>N</b>	16
<b>n</b>	6
<b>F<sub>cal</sub></b>	0.725
<b>F<sub>tab</sub> (<math>\alpha=0.05;4,10</math>) [8]</b>	3.48

A donar la F calculada menor a la F tabulada indica que s'ajusta bé al model de línia recta.

#### 4.4.5 Beta-carotè

Es va fer una dissolució mare tal i com s'indica anteriorment pesant aproximadament 0.02 g de patró de beta-carotè i d'aquesta dissolució mare es preparen 3 dissolucions intermèdies, diluint 10 ml de solució mare en 50 ml d'hexà i a partir de cadascuna d'elles patrons de tal manera que la recta estigui formada per patrons de diferents mares minimitzant així l'error analític. Les dilucions i concentracions esperades dels patrons són les indicades per la següent taula.

Taula 23. Dilucions i concentracions teòriques dels patrons de beta-carotè

Patró	V. pipetejat (ml)	V. aforat (ml)	Concentració (mg/l)
1	0,1	50	0,16
2	0,3	50	0,48
3	0,8	50	1,28
4	0,4	10	3,19
5	0,7	10	5,59
6	0,9	10	7,19

Els cromatogrames que s'obtinguin són com el de la figura 15.

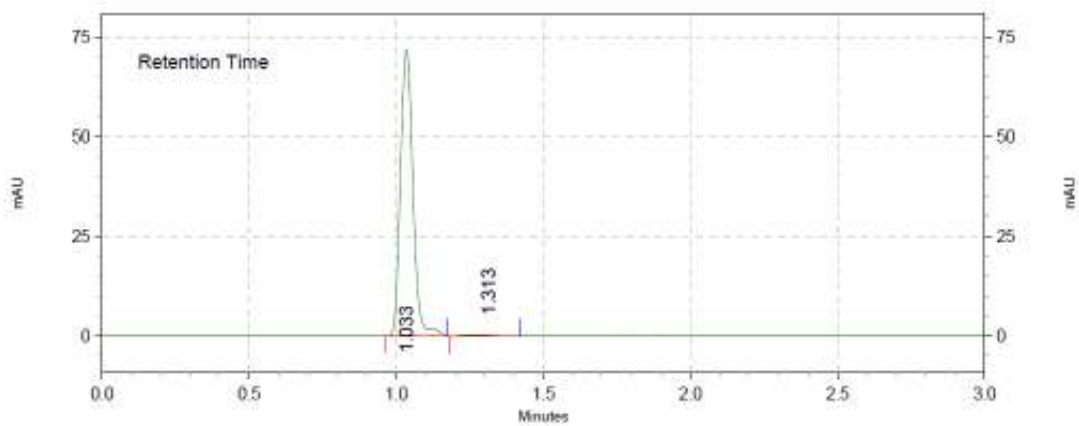


Figura 26. Cromatograma d'un patró de beta-carotè

En la figura anterior es pot observar com el beta-carotè surt a un temps de retenció aproximat d'1,03 minuts i surt acoblat al pic de fase motiu pel qual a cada pic obtingut se li haurà de restar el blanc que correspondria al dissolvent.

La recta que es va obtenir a partir dels patrons ve donada a la figura 27.

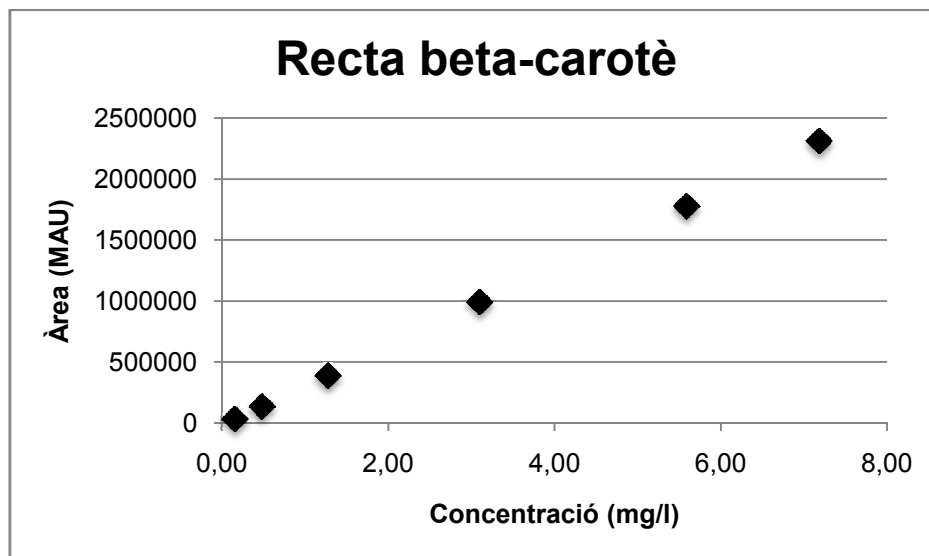


Figura 27. Recta del beta-carotè

Un cop que es té la recta per validar-la es miren el coeficient de correlació per veure si els valors s'ajusten al model de línia recta i es miren els residuals.

Taula 24. Paràmetres de la recta

Pendent	Ordenada a l'origen	Coefficient de correlació
323711	-23807	0,999

El coeficient de correlació obtingut de l'ajust dels valors experimental a una recta per el mètode de mínims quadrats és molt proper a 1 indicant un bon ajust dels valors al model.

Com s'ha mencionat prèviament també es calcularan els residuals de cada valor a partir de la fórmula de la figura 14.

A la figura 28 es pot observar el gràfic dels residuals obtingut dels diferents valors experimentals.

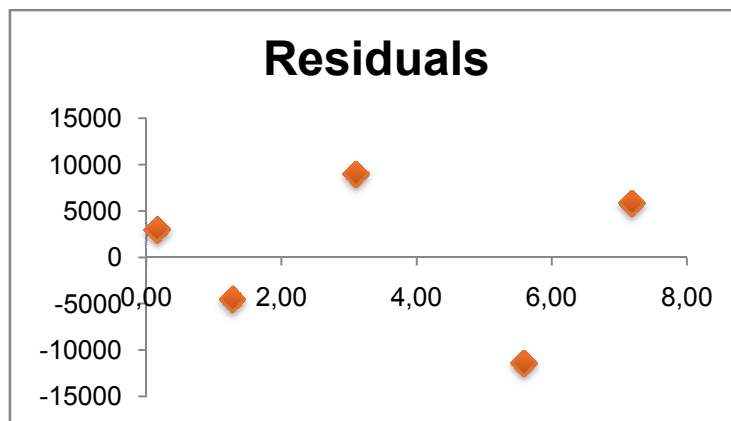


Figura 28. Gràfic de residuals

Es pot observar com els residuals no segueixen tendències i hi ha el mateix nombre de residuals positius que negatius. [12]

A la taula següent es pot observar si els valors de la y de la recta estan entre en 90-110 % del valor dels patrons experimentals.

Taula 25. Resultats de la  $y_i$  i  $\hat{y}_i$ 

$x_i$	$y_i$	$\hat{y}_i$	
0,16	30890	27904	<b>110%</b>
0,49	131656	133563	<b>99%</b>
1,28	385352	389881	<b>99%</b>
3,10	989578,3	980579	<b>101%</b>
5,59	1774677	1786076	<b>99%</b>
7,19	2309035	2303186	<b>100%</b>

#### 4.4.5 Determinació dels factors de resposta

Un cop que es tenen totes les rectes patrons fetes i validades es van calcular els factor de resposta de cada analit.

Taula 26. Factors de resposta de cada analit

Carotenoide	Pendent de la recta	Factor de resposta relatiu
Beta-carotè	323711	1,0000
Cantaxantina	309835	0,9571
Luteïna (concentrada)	313020	0,9670
Luteïna (diluïda)	303430	0,9373

Les àrees a prop del pic del beta-carotè es faran amb el factor de resposta del beta-carotè, les properes a la luteïna amb el coeficient de la luteïna i si hi ha cantaxantina les properes a la cantaxantina amb el seu factor.

Com en el cromatograma pot haver àrees que es trobin fora de la calibració per ser massa baixes i com per tenir els carotenoides totals és la suma de la concentració de carotenoides que dona l'àrea de cada pic del cromatograma, es van sumar totes les àrees que es calculaven amb el mateix factor de resposta, excepte les del pigment que es vol analitzar, ja sigui la t-luteïna o la t-cantaxantina i es calcularà la concentració a partir d'aquesta suma.

Els intervals de temps de retenció en els quals correspondrà el factor de cada carotenoide estan descrits a la taula 27.

Taula 27. Interval de temps que correspon a cada carotenoide

Interval de temps de retenció	Carotenoide
0-3 min	beta-carotè (si hi ha cantaxantina de 0-1,8 min)
1,8-3 min	cantaxantina (si hi ha)
3-16 min	luteïna

A partir de 3 es considera la luteïna perquè és el temps de retenció a partir del qual normalment surten les xantofil·les i a diferència del beta-carotè la luteïna és una xantofil·la.

## 5. Resultats

### 5.1 Mostres utilitzades per la validació del mètode

Per validar el mètode es va preparar dos pinsos els quals es van anomenar A i B, un amb només luteïna i un altre amb luteïna i cantaxantina. Les concentracions d'aquests dos analits es poden observar a la taula següent

Taula 28. Concentracions d'analits en les mostres de pinso analitzades

Mostra	ppm t-luteïna	ppm cantaxantina	CT
Pinso A	4,63	3,22	8,81
Pinso B	45,67	0	61,22

### 5.2 Selectivitat

La selectivitat mira que la senyal mesurada no sigui influenciada per altres substàncies o que la contribució d'aquestes es tregui. La selectivitat es va determinar mirant el blanc per veure si en aquest hi hauria algun pic al mateix temps de retenció on surt l'analit d'interès. [15]

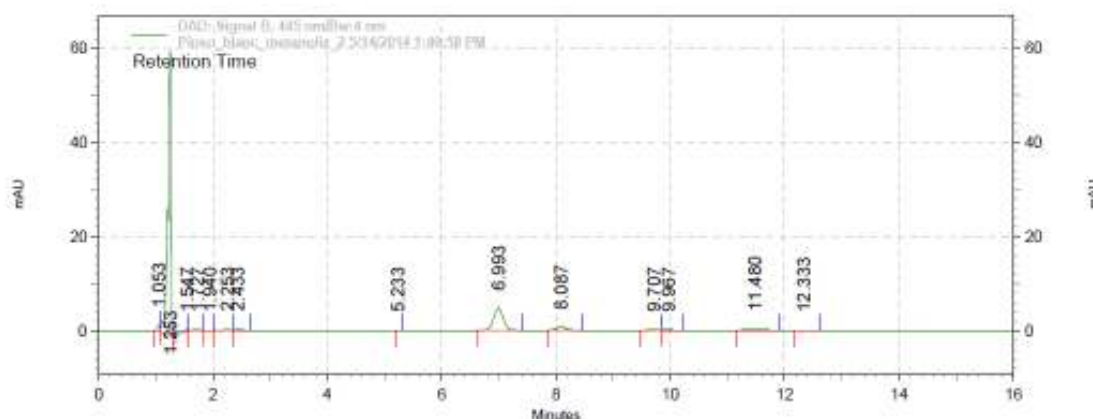


Figura 29. Cromatograma del blanc del pinso saponificat utilitzant KOH metanòlic

En el cromatograma de la figura anterior es pot observar que quan es fa l'anàlisi amb KOH metanòlic no hi ha cap pic en el temps de retenció de la cantaxantina. En el temps de retenció de la t-luteïna hi ha un pic que correspon a la quantitat de t-luteïna pròpia d'altres components del pinso, un cop feta la saponificació del pinso sense haver afegit pigment. Per tant si es vol saber la quantitat afegida d'aquesta t-luteïna sempre s'haurà de restar el blanc.

Si l'extracció de la cantaxantina es fa amb KOH aquós el cromatograma del blanc variarà i serà com el de la figura 30.

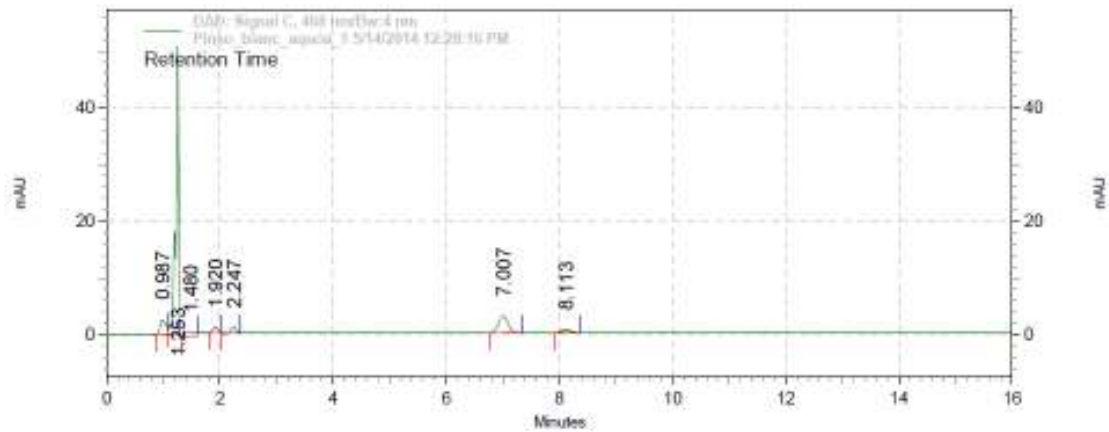


Figura 30. Cromatograma del blanc del pinso saponificat uilitzant KOH aquós

En el cromatograma anterior s'observa com el pic de la t-luteïna continua present i aproximadament en el temps de retenció de la cantaxantina hi ha un pic que per saber afegida de cantaxantina la quantitat vindria d'aquest pic s'hauria de restar.

En el cas de només dur a terme una extracció, sense fer una saponificació o desencapsulació de la cantaxantina,, el cromatograma mostrarà els pics de la següent figura.

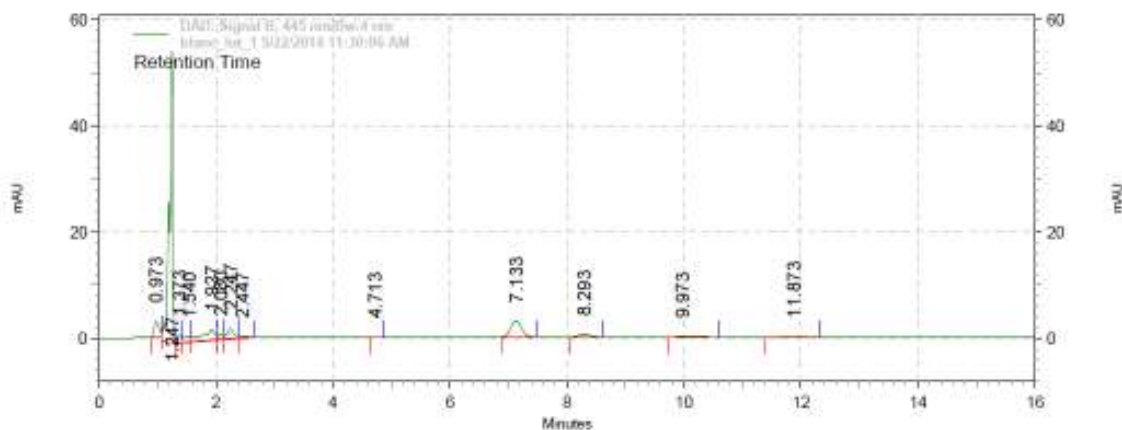


Figura 31. Cromatograma de l'extracció d'un pinso blanc sense saponificació

El pic corresponent a la t-luteïna indica que tot i no saponificar hi haurà una part de carotenoides que s'extrauran del pinso, fent que sempre s'hagi d'analitzar un blanc de la mostra si es vol saber el contingut de carotenoides, en particular de t-luteïna que se li ha afegit a la mostra.

### 5.3 Linealitat

La linealitat de cada carotenoide correspondrà a l'interval de concentracions en els quals ja s'ha establert que la resposta dels analits segueixen un comportament lineal. Aquest interval correspondrà al mateix en el que es troba l'interval de calibratge.

Aquest interval de concentracions si s'agafessin 5 g de pinso ve donat a continuació. [15]

Beta-carotè: 1,6 a 71 ppm

Luteïna: 1 a 127 ppm

Cantaxantina: 1 a 15 ppm

## 5.4 Robustesa

La robustesa ens indica que tant sensible es un mètode a l'aplicar petites variacions en el procediment o les condicions. Les que s'han tingut en compte són variacions de pes i si s'ha d'agitar o no la mostra durant la saponificació. [15]

### 5.4.1 Variació de pes

Com són petites variacions en el pes anteriorment s'havia escollit 5g de pinso com la quantitat que s'havia de pesar, les variacions de pes que s'han dut a terme són 4g i 7,5g.

Taula 29. Resultat de les variacions de pes en el pinso A

Mostra	Concentració (ppm)		% RSD	
	t-Luteïna	Cantaxantina	t-Luteïna	Cantaxantina
4 g	2,05	1,82	6,8	50,2
	2,27	2,48		
	1,86	1,38		
5 g	4,86	4,48	5,3	27,1
	5,51	4,23		
	4,91	2,78		
7,5 g	4,51	3,19	1,2	19,2
	4,60	2,87		
	4,70	3,06		

Es pot observar com la desviació estàndard relativa de la cantaxantina és molt més gran que la de la luteïna. Això pot ser degut a que hi ha molt poca quantitat de cantaxantina en el pinso i la cantaxantina es troba en forma de partícules de major mida que la luteïna provocant que aquesta no estigui ben dispersada. També es pot observar com la concentració de luteïna augmenta a l'augmentar el pes tot i que no varia gaire entre 5 i 7,5 g, això es degut a la baixa quantitat de luteïna que hi ha a la mostra, llavors com més mostra s'agafi per analitzar millors resultats donarà.

Degut als resultats que es van trobar en el anàlisi anterior es va mirar de pujar més la quantitat pesada per veure si així disminuïa la RSD de la cantaxantina. Es va analitzar

el mateix pinso i es van fer tres rèpliques de l'assaig pesant 7,5 g i 10 g. Els resultats es poden observar a la taula següent.

Taula 30. Concentració de cantaxantina i t-luteïna a l'augmentar la mida de mostra del pinso A

Mostra	Cantaxantina (ppm)	t-luteïna (ppm)	% RSD cantaxantina	% RSD t-luteïna
7,5 g	1,37	3,01	35,85	13,68
	1,81	3,03		
	2,76	3,79		
10 g	2,02	2,15	13,33	18,09
	1,81	3,08		
	1,55	2,84		

En la taula anterior es pot observar com la RSD de la cantaxantina si que baixa a l'augmentar el pes, però la de la t-luteïna augmenta. A més la concentració de cantaxantina que mostra la taula anterior es significativament diferent que la de la taula 29 indicant així que els assajos no són reproduïbles i també que la cantaxantina no es troba ben dispersada en el pinso provocant que hi hagi errors, ja que a l'haver poca quantitat d'aquest analit a la mostra es molt fàcil que entre anàlisis hi hagi molt error. Aquests anàlisis també indiquen que el mètode emprat no es un bon mètode per analitzar la cantaxantina quan es troba a aquestes concentracions. Tot i així es continua observant com a l'augmentar la mida de mostra inicial el %RSD disminueix.

A més de fer-ho amb un pinso de baixa concentració també es va mirar la robustesa amb un pinso que contingués major concentració en luteïna, el resultats es poden observar en la taula següent.

Taula 31. Resultat de les variacions de pes en el pinso B

Mostra	Concentració t-luteïna (ppm)	Mitjana (ppm)	% RSD Luteïna
4 g	45,40	44,53	2,17
	43,49		
	44,69		
7,5 g	47,38	48,13	1,53
	48,18		
	48,84		

Els resultats que mostra la taula anterior indiquen que a l'augmentar el pes hi ha un augment en la concentració trobada de t-luteïna a la mostra a més que la %RSD indica que hi una disminució en aquesta fent que els assajos siguin més repetibles, com més gran sigui la mida de la mostra.

### 5.4.2 Agitació o no agitació

Un paràmetre considerat important és la necessitat de l'agitació durant la saponificació, anteriorment es va establir que aquesta saponificació s'havia de dur a terme durant un període de 24 hores durant les quals la mostra havia d'estar a les fosques per evitar la degradació dels carotenoides per l'acció de la llum solar i agitar aquesta mostra cada cert temps per assegurar que es saponifica totalment. Per les raons abans donades es va dur a terme dos tipus d'assajos un en el qual la mostra seria agitada durant 2 minuts cada hora amb ajuda d'un iman a l'agitador magnètic i l'altre que no s'agitaria.

Taula 32. Resultats de l'anàlisi utilitzant o no agitació

Tipus d'assaig	Concentració (ppm)		%RSD	
	Cantaxantina	t-Luteïna	Cantaxantina	t-Luteïna
Agitant	3,85	4,41	34,2	2,7
	2,39	4,20		
	2,76	4,48		
No agitant	3,18	4,39	9,6	3,4
	3,42	4,48		
	2,96	4,13		

Els resultats de la taula anterior mostren que quan la mostra s'agita hi ha un augment en la RSD de la cantaxantina, tot i que degut que aquesta no estroba homogèniament a tota la mostra no es pot tenir massa en compte, però la RSD de la luteïna és més baixa quan s'agita la mostra, per tant per millorar la repetibilitat si es saponifica la mostra aquesta s'agitarà de tant en tant.

### 5.5 Precisió

Per mirar la precisió del mètode es van comparar els resultats del mètode prèviament establert on es feia l'anàlisi de carotenoides totals amb l'espectrofotòmetre i el mètode que es volia validar. Els resultats de les concentracions donades venen donades a la taula següent.

Taula 33. Comparació de dos mètodes d'anàlisi de pinso

Repetició	CT (ppm) HPLC	CT (ppm) espectrofotòmetre
1	63,24	69,79
2	67,49	65,80
3	66,75	65,87
4	65,61	64,41
5	66,97	66,10
<b>Mitjana</b>	<b>66,01</b>	<b>66,39</b>
<b>s<sup>2</sup></b>	<b>2,87</b>	<b>4,03</b>

Per determinar si els dos mètodes són comparables es va dur a terme un test t de comparació de mitjanes, abans del qual es va utilitzar un test F de comparació de variàncies. Els resultats del test F es poden observar a la taula següent.

Taula 34. Càlcul de la F calculada

<b>Comparació dels dos mètodes</b>	
$s_1^2$	4,03
$s_2^2$	2,87
$F_{cal}$	<b>1,40</b>

Com la F calculada dona un valor menor a la tabulada que per 4 i 4 graus de llibertat amb una  $\alpha$  de 0,05 es de 6,39 [8] s'utilitzarà la fórmula de la figura 10 corresponent.

Taula 35. Càlcul de la t calculada

<b>Comparació dels dos mètodes</b>	
$s_p^2$	3,45
$t_{cal}$	0,32
$t_{tab}(\alpha=0.05;8)$ [8]	1,86

Com la t calculada és menor a la tabulada els dos mètodes són comparables, per tant el mètode que s'ha desenvolupat és vàlid i comparable amb el mètode anterior. [7]

## 5.6 Repetibilitat

La repetibilitat és la precisió mesurada sota condicions de repetibilitat que són les condicions on s'obtenen resultats independents obtinguts amb el mateix mètode utilitzant el mateix material, el mateix laboratori per el mateix analista utilitzant el mateix equip en curts intervals de temps. [15]

Per fer l'avaluació de la repetibilitat es van dur a terme 6 assajos del pinso B de manera paral·lela. El motiu de només 6 assajos es degut a que fos el més repetible possible i dur-los a terme tots en les mateixes condicions. Un cop s'obtenen els cromatogrames, a partir de la fórmula que ve abans en la figura es calculen els carotenoides totals i la t-luteïna present a la mostra.

En la següent figura s'observa el cromatograma de l'anàlisi del pinso d'una de les rèpliques de la repetibilitat. El pic d'interès, la t-luteïna es el pic que surt a un temps de retenció aproximat de 7 minuts i el pic de fase surt a 1,2 minuts.

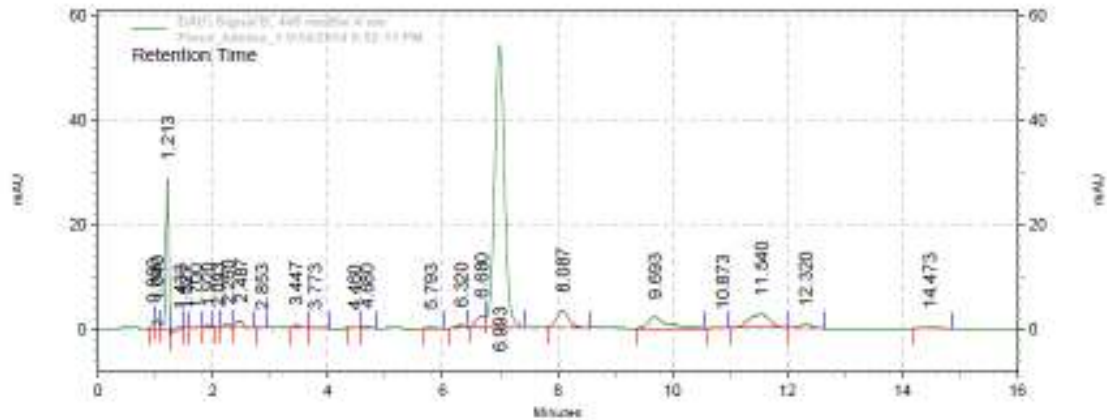


Figura 32. Cromatogram del pinso B

En la següent taula es pot veure un exemple d'un assaig on es veuen les àrees de s'obtenen del pinso, de quin carotenoide utilitzaran el factor de resposta i a la taula els resultats de carotenoides totals.

Taula 36. Temps de retenció, àrea i carotenoide del qual utilitzaran el factor de resposta

t retenció	Àrea (mAU)	Carotenoide
0,960	10388	beta-carotè
1,040	11915	beta-carotè
1,113	6634	beta-carotè
1,913	9721	beta-carotè
2,260	18808	beta-carotè
2,487	23895	beta-carotè
2,847	1230	beta-carotè
3,447	8776	luteïna
3,773	2423	luteïna
4,460	926	luteïna
4,680	4282	luteïna
5,793	2917	luteïna
6,320	7016	luteïna
6,680	46341	luteïna
6,993	1336221	t-luteïna
8,087	100241	luteïna
9,693	102392	luteïna
10,873	759	luteïna
11,540	138868	luteïna
12,320	22137	luteïna
14,473	9745	luteïna

Taula 37. Carotenoides totals i ppm de cadascun d'ells de la mostra 1

Carotenoide	Àrea (mAU)	RFF	c <sub>p</sub>	ppm
beta-caroté	81431	1,0000	0,33	3,23
xantofil·les	446327	0,9373	1,14	16,30
t-luteïna	1367591	0,9670	4,30	44,10
<b>Carotenoides totals</b>				<b>63,63</b>

Les xantofil·les és la suma de tots els carotenoides que utilitzen el factor de resposta de la luteïna, com ve descrit a la taula 36, excepte la t-luteïna. Aquestes xantofil·les són les diferents cis-luteïna i la t-zeaxantina entre d'altres.

Com totes els cromatogrames i taules de resultats són semblants a partir d'ara els resultats vindran en una taula on mostra el número de mostra, els carotenoides totals i els ppm de luteïna presents.

Taula 38. Resultats dels assajos de repetibilitat

Repetició	t-luteïna (ppm)	Carotenoides totals (ppm)
1	42,79	59,63
2	45,23	63,88
3	44,81	63,14
4	44,01	62,01
5	45,71	63,91
6	44,47	63,37
<b>Mitjana</b>	<b>44,50</b>	<b>62,66</b>
<b>Desviació estàndard</b>	<b>1,02</b>	<b>1,63</b>

La repetibilitat vindrà en termes de desviació estàndard relativa i es calcularà utilitzant la fórmula de la figura 6. Els resultats de la RSD venen donats a la taula 39 que es mostra a continuació.

Taula 39. %RSD de la repetibilitat

t-luteïna	Carotenoides totals
2,29	2,60

Aquests resultats de %RSD són bons i mostren que el mètode és repetible, tenint en compte que la matriu de la mostra és pinso que és una matriu difícil d'analitzar degut a que no és massa homogenia.

## 5.7 Reproductibilitat

La reproductibilitat es troba sota condicions en què es canvia d'analista, instrument i equip, no es farà una mesura de la reproductibilitat sinó de precisió sota condicions de precisió intermèdies on en aquest cas només es canviarà el dia. [15]

Els resultats del primer dia es poden veure a la taula 38 i els del segon dia a la taula següent.

Taula 40. Resultats del'anàlisi dels pinso B

Repetició	t- luteïna (ppm)	Carotenoides totals (ppm)
<b>1</b>	46,74	65,81
<b>2</b>	46,30	65,03
<b>3</b>	47,68	67,02
<b>4</b>	46,94	65,90
<b>5</b>	47,62	65,49
<b>6</b>	46,69	63,86
<b>Mitjana</b>	<b>46,49</b>	<b>65,52</b>
<b>Desviació estàndard</b>	<b>0,55</b>	<b>1,04</b>

La repetibilitat en condicions intermèdies serà %RSD dels resultats dels 2 dies.

Taula 41. %RSD en condicions de precisió intermèdia

t-luteïna	Carotenoides totals
3,32	3,10

Tenint en compte que es tracta d'una matriu complicada com pot ésser el pinso que no és homogeni, els resultats obtinguts en termes de precisió entre dies són bastant bons.

## 5.8 Límit de detecció i límit de quantificació

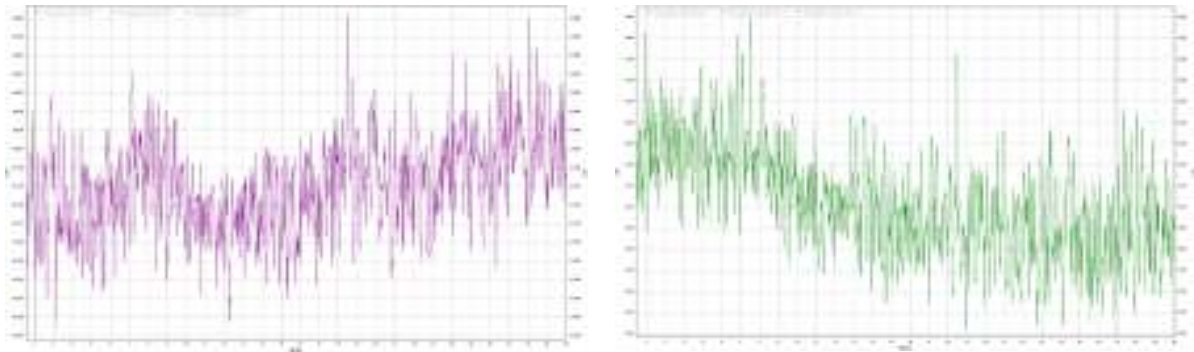
El límit de detecció és la concentració mínima d'un analit que pot ser distingida del soroll de fons.

Hi ha molts mètodes per la determinació del límit de detecció, com es treballen amb cromatogrames una manera de determinar el límit de detecció és quan la senyal que dona l'analit és tres vegades la senyal del soroll de fons i per el límit de quantificació aquesta senyal ha de ser 10 vegades major. [16]

L'alçada del soroll de fons es va determinar punxant un blanc amb només dissolvent i mesurant unes 10 alçades de pic i fent-ne la mitjana per les longituds d'ona de la luteïna i la cantaxantina.

A la figura 33 es pot observar una ampliació de la línia base del blanc que mostra el soroll de fons d'aquest a 445 i 468 nm i a la taula 42 les alçades mesurades i la seva mitjana.

Figura 33. Soroll de fons del blanc a 445 nm (lila) i a 468 nm (verd)



Taula 42. Alçada de diferents pics del soroll de fons

Alçada a 445 nm (mAU)	Alçada a 468 nm (mAU)
0,023	0,045
0,025	0,057
0,024	0,040
0,023	0,035
0,026	0,042
0,016	0,027
0,025	0,048
0,018	0,031
0,019	0,033
0,011	0,027
<b>0,021</b>	<b>0,039</b>

A partir d'aquestes alçades es calcula l'alçada que haurien de fer els límits de detecció i quantificació multiplicat aquestes alçades per 3 i 10 respectivament i a partir de l'alçada i concentració del pic de més baixa concentració es treuen els límits de detecció i quantificació teòrics.

Taula 43. Concentracions teòriques del LOD i el LOQ

	Concentració patró 1 (mg/l)	Alçada (mAU)	Concentració LOD	Concentració LOQ
<b>Luteïna</b>	0,11	0,85	0.0082	0,0273
<b>Cantaxantina</b>	0,10	2,54	0,0047	0,0158

Un cop es tenen les concentracions teòriques es van fer solucions de concentració semblant al LOD i LOQ dels patrons de luteïna i cantaxantina per veure les concentracions corresponents al LOD i LOQ de la luteïna i cantaxantina. A continuació es mostren els cromatogrames de patrons de cantaxantina.

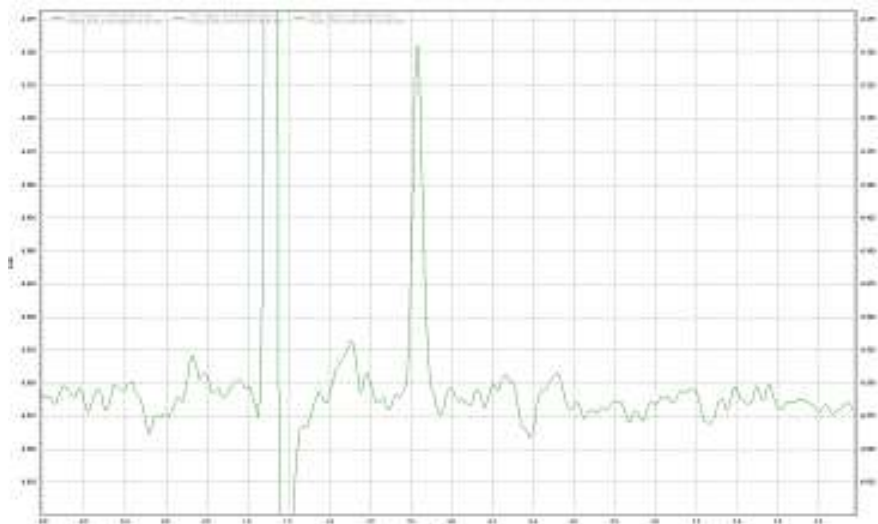


Figura 34. LOD cantaxantina

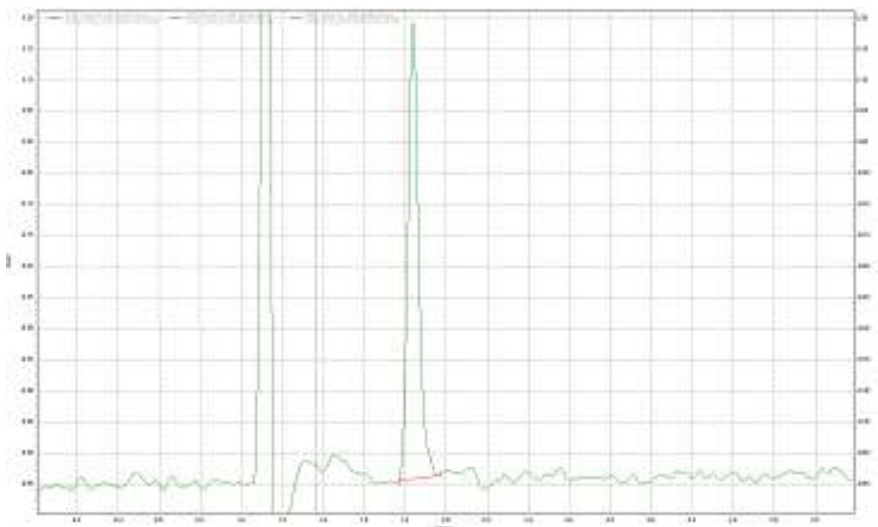


Figura 35. LOQ cantaxantina

En la figura 34 es pot observar com el pic corresponent a la cantaxantina que surt a un temps de retenció aproximat de 1,9 minuts és aproximadament 3 vegades major que el soroll de fons. El pic de la cantaxantina de la figura 35 és 10 vegades major i es pot integrar bé sense fer massa error. Aquests resultats indiquen que les concentracions d'aquests patrons correspondran al LOD i al LOQ respectivament. La concentració del patró corresponent al cromatograma i la concentració del LOD i el LOQ si s'agafen 5 grams de pinso venen donades a la taula 44.

Taula 44. LOD i LOQ de la cantaxantina en el patró i en el pinso

Mostra	LOD	LOQ
Patró	0,0055 mg/l	0,0161 mg/l
Pinso	0,055 ppm	0,161 ppm

A continuació es mostren els cromatogrames corresponents a patrons de luteïna.

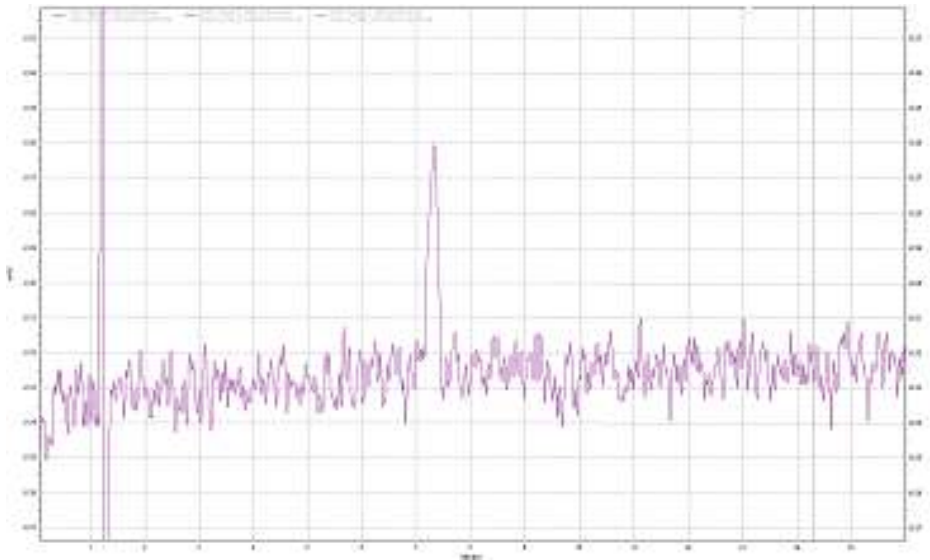


Figura 36. LOD luteïna

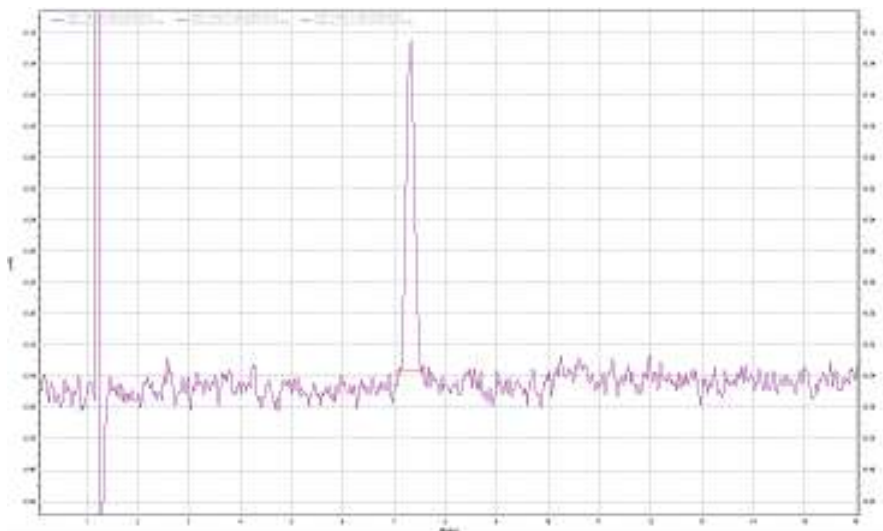


Figura 37. LOQ luteïna

En la figura 36 es pot observar com el pic de la trans-luteïna a un temps de retenció aproximadament de 7 minuts és tres vegades major que el soroll de fons i deu vegades major en la figura 37. La concentració del patró mesurat i la concentració del LOD i el LOQ en el pinso venen donades en la taula 45.

Taula 45. LOD i LOQ de la luteïna en el patró i el pinso

Mostra	LOD	LOQ
<b>Patró</b>	0,0089 mg/l	0,0287 mg/l
<b>Pinso</b>	0,089 ppm	0,287 ppm

## 5.9 Recuperació

La recuperació es va dur a terme mitjançant l'anàlisi de dos pinsos amb concentracions diferents de trans-luteïna. Un pinso amb una concentració baixa i l'altre amb una concentració alta d'aquest pigment. Es va calcular la recuperació respecte els carotenoides totals i trans-luteïna dels pinsos A i B. D'aquests pinsos preparats es tenien les concentracions teòriques de trans-luteïna i carotenoides totals presents a partir de les quantitats que es van afegir de l'additiu que contenia luteïna. A la taula 28 es poden observar les concentracions teòriques tant de trans-luteïna com de carotenoides totals.

Es van fer tres rèpliques de cada assaig per determinar la recuperació de cada producte. Els resultats de cadascun dels assajos i la recuperació es poden observar en la taula 46.

Taula 46. Resultats de la recuperació en el pinso B

	Carotenoides totals (ppm)	t-luteïna (ppm)	Recuperació CT	Recuperació t-luteïna
<b>1</b>	64,94	46,29	106%	<b>101%</b>
<b>2</b>	64,17	45,86	105%	<b>100%</b>
<b>3</b>	66,14	47,22	108%	<b>103%</b>

Les recuperacions obtingudes del pinso B són molt bones i demostra que el mètode utilitzat per a la determinació de la trans-luteïna funciona bé. Les recuperacions superiors al 100 % poden ser degudes a algun error analític o que la mostra agafada tingüés una mica més de carotenoides del normal.

Taula 47. Resultats de la recuperació en el pinso A

	Carotenoides totals (ppm)	t-luteïna (ppm)	Recuperació CT	Recuperació t-luteïna
<b>1</b>	8,03	5,20	85%	<b>112%</b>
<b>2</b>	7,87	5,16	83%	<b>112%</b>
<b>3</b>	7,85	5,18	83%	<b>112%</b>

Els resultats de recuperació superiors al 110 % en t-luteïna poden ser deguts a que al ser tant poca quantitat de l'analit al pinso hi hagués una petita variació en la quantitat de luteïna que hi hagués al blanc que es va mesurar i el que contenia el pinso provocant aquesta variació. La menor recuperació en

carotenoides totals, que és inferior al 90 % es deguda a que a l'haver menor quantitat de producte que es va afegir hi ha pic del cromatograma que no es poden integrar degut al soroll de fons i n'hi ha altres que en el pinso A que es de menor concentració no es poden detectar i quantificar i en el pinso B si que ho poden ser. Això pot ser arreglat si s'augmenta la quantitat de mostra punxada a l'HPLC.

## **6. Conclusions**

The method based on the determination of trans-lutein using standards and a response factor is good since the experimental results match with the theoretical ones and they show a good repeatability.

This method it is not useful for the determination of canthaxanthin since the results does not match with the theoretical ones, also they are not repeatable and the RSD is not good.

The method is useful for the determination of total carotenoids in large concentration added to the feed. The lack of recover in low concentrated feeds could be solved by increasing the volume analysed by HPLC. Also the results of this determination match with the results using the AOAC official method.

## **7. Bibliografia**

- [1] Natural Colorants for food and nutraceutical uses, F. Delgado-Vargas, O. Paredes-Lopez, CRC Press, 2003, United States, pag 35-37
- [2] Natural Colorants for food and nutraceutical uses, F. Delgado-Vargas, O. Paredes-Lopez, CRC Press, 2003, United States, pag 113-136
- [3] Química de los alimentos, O.R. Fennema, Acirbia 2n edició, Zaragoza, 2000 pag 750
- [4] Practical High-Performance Liquid Chromatography, V.R: Meyer, Wiley, 2010, Switzerland
- [5] AOAC Official method 970.64 Carotenes and Xanthophylls in dried plant materials and mixed feeds
- [6] Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A, D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, Elsevier, 1997, pag 27
- [7] Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A, D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, Elsevier, 1997, pag 93-105
- [8] Statistics for the quality control chemistry laboratory Eamon Mullins Cambridge : The Royal Society of Chemistry, cop. 2003, pag 431-446
- [9] FEFANA Simultaneous determination of lutein, zeaxanthin and capsanthin telquel, in premixes and in feed
- [10] Merck Index 12th Ed. Ref. 1798
- [11] Carotenoids, Volume 1B: Spectroscopy, edited: G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, 1995, Switzerland
- [12] Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A, D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, Elsevier, 1997, pag 179-180
- [13] Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A, D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, Elsevier, 1997, pag 300
- [14] Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A, D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, Elsevier, 1997, pag 180-185
- [15] Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A, D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, Elsevier, 1997, pag 380-392

[16] Statistics for the quality control chemistry laboratory Eamon Mullins  
Cambridge : The Royal Society of Chemistry, cop. 2003, pag 275-278



Validació d'un mètode per a la determinació de pigments en pinso by [Moreno Gómez, Dulcenombre de Maria Ribera, David](#) is licensed under a [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional License](#).

Puede hallar permisos más allá de los concedidos con esta licencia en <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.ca>