

**NMX-Y-124-SCFI-2003**

**PRODUCTOS PARA USO AGROPECUARIO - INGREDIENTES  
DE ALIMENTOS BALANCEADOS PARA ANIMALES - VITAMINA  
A ACETATO - ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA**

**PRODUCTS FOR AGRICULTURAL USE - BALANCED FEED  
INGREDIENTS FOR ANIMALS - VITAMIN A ACETATE -  
SPECIFICATIONS AND TEST METHODS**

## PREFACIO

En la elaboración de la presente norma mexicana participaron las siguientes empresas e instituciones:

- ADISSEO DE MÉXICO, S.A. DE C.V.
- ASOCIACIÓN NACIONAL DE FABRICANTES DE ALIMENTOS PECUARIOS BALANCEADOS, A.C.
- BASF MEXICANA, S.A. de C.V.
- CÁMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA DE TRANSFORMACIÓN Sección 49, Fabricantes de Alimentos Balanceados para Animales.
- COMITÉ TÉCNICO DE NORMALIZACIÓN NACIONAL DE ALIMENTOS PARA ANIMALES
- DEGUSSA MÉXICO, S.A. de C.V.
- HELM DE MÉXICO, S.A.
- MALTA TEXO, S.A. DE C.V.
- NUTEK, S.A. DE C.V.
- ROCHE VITAMINAS MÉXICO, S.A. DE C.V.
- VIMIFOS, S.A. DE C.V.

## NMX-Y-124-SCFI-2003



### **PRODUCTOS PARA USO AGROPECUARIO - INGREDIENTES DE ALIMENTOS BALANCEADOS PARA ANIMALES - VITAMINA A ACETATO - ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA**

### **PRODUCTS FOR AGRICULTURAL USE - BALANCED FEED INGREDIENTS FOR ANIMALS - VITAMIN A ACETATE - SPECIFICATIONS AND TEST METHODS**

#### **1 OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN**

Esta norma mexicana establece las características y métodos de análisis de la vitamina A acetato, para ser utilizada como ingrediente en alimentos balanceados para animales.

#### **2 REFERENCIAS**

Para la correcta aplicación de esta norma se debe consultar la siguiente norma oficial mexicana y norma mexicana vigente o las que las sustituyan:

NOM-012-ZOO-1993      Especificaciones para la regulación de productos químicos, farmacéuticos, biológicos y alimenticios para uso en animales o consumo por éstos, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 17 de enero de 1995.

NMX-Y-111-SCFI-2001      Alimentos para animales - Muestreo de alimentos balanceados e ingredientes mayores para animales. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 18 de julio de 2001.

### **3 DEFINICIÓN**

La vitamina A Acetato es un producto químico obtenido por la conversión de los carotenoides (provitaminas), consiste en un éster o mezcla de ésteres de retinol (acetato, propionato y palmitato).

### **4 CLASIFICACIÓN**

La vitamina A puede existir en diferentes formas isoméricas; la all-trans-vitamina A (forma con alta actividad biológica) y el 13-cis-isómero. Estos son los dos isómeros más importantes por su alta biodisponibilidad.

Se le conoce a la Vitamina A como Retinol, all-trans-retinol, 3,7-dimetil-9 (2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-yl)-2,4,6,8-nonatetraen-1-ol.

1 UI = 0,344 microgramos de vitamina A Acetato = 1 unidad de USP.

### **5 ESPECIFICACIONES**

La vitamina A Acetato en los productos comerciales debe cumplir con las especificaciones y características que se establecen en las tablas 1 y 2.

### **6 MUESTREO**

El muestreo se debe basar en la norma oficial mexicana NOM-012-ZOO y en la norma mexicana NMX-Y-111-SCFI (ver 2 Referencias).

**TABLA 1.- Especificaciones y características de la vitamina A mínimo 500,000 UI**

ESPECIFICACIONES	CARACTERÍSTICAS
Contenido activo según especifique el producto comercial	Mín. 500,000 UI
Olor	Característico del producto
Color	Pardo hasta café
Aspecto o presentación	Polvo fino o granular
Solubilidad, dependiendo del recubrimiento del producto comercial (algunas presentaciones son hidrodispersables)	Insoluble en agua, poco soluble en grasas y aceites Soluble en alcohol, muy soluble en éter, cloroformo y hexano
Peso específico	0,5 g/cm <sup>3</sup>
Pérdida por secado a 105°C / 4h	Máximo 5 %
Tamaño de partícula / granulometría Vitamina A recubierta	97 % < 0,63 mm o 100 % - A través de malla No. 20 Mín. 90 % - A través de malla No. 40 Máx. 15 % - A través de malla No. 100 Máx. 12 % - A través de malla No. 140
Tamaño de partícula / granulometría Vitamina A hidrodispersable	95 % < 0,6 mm o Mín. 99 % - A través de malla No. 35 Mín. 30 % - A través de malla No. 100

**TABLA 2.- Especificaciones y características de la vitamina A mínimo 1,000,000 UI**

ESPECIFICACIONES	CARACTERÍSTICAS
Contenido activo según especifique el producto comercial	Mín. 1,000,000 UI
Olor	Característico del producto
Color	Pardo hasta café
Aspecto o presentación	Polvo fino o granular
Solubilidad, dependiendo del recubrimiento del producto comercial (algunas presentaciones son hidrodispersables)	Insoluble en agua, poco soluble en grasas y aceites Soluble en alcohol, muy soluble en éter, cloroformo y hexano
Peso específico	0,55 g/cm <sup>3</sup>
Pérdida por secado a 105°C / 4h	Máximo 5 %
Tamaño de partícula / granulometría	97 % < 0,63 mm

## 7 MÉTODOS DE PRUEBA

Para la comprobación de las especificaciones que se establecen en esta norma, se deben aplicar los siguientes métodos, mismos que son alternativos:

## 7.1 Determinación de vitamina A. Método HPLC

### 7.1.1 Principio

Cuantificar la vitamina A en presentaciones comerciales por cromatografía de líquidos de alta resolución.

### 7.1.2 Fundamento

La muestra de ensayo se extrae con una solución de hexano:acetona:alcohol absoluto:tolueno (10:7:6:7), se saponifica y el extracto se separa y cuantifica mediante cromatografía líquida de alta resolución.

### 7.1.3 Alcance

Aplicable a materiales puros o con concentraciones de vitamina A de 500,000 UI/kg a 25,000,000 UI/kg.

### 7.1.4 Material y equipo

- Balanza analítica con sensibilidad de 0,1 mg;
- Cromatógrafo de líquidos;
- Detector UV calibrado a 325 nm;
- Columna C18 (4,5 x 250 mm), y
- Baño María calibrado a 55°C.

### 7.1.5 Reactivos

- Acetona.- Seca, libre de alcohol;
- Hexano.- Alta pureza o equivalente;
- Alcohol absoluto;
- Tolueno;
- Extractante.- Hexano-acetona-alcohol absoluto-tolueno (10:7:6:7);
- Hidróxido de potasio metanólico (40 %). - Disuelva 40 g de KOH en metanol, enfríe, diluya a 100 ml con metanol;
- Metanol HPLC;
- Metanol grado reactivo;
- Agua desionizada;
- Solución de sulfato de sodio al 10 %. - Disuelva 10 g de sulfato de sodio anhidro en 100 ml de agua;
- Fase móvil.- Metanol HPLC-agua desionizada y desgasificada (95:5), y
- Solución estándar de referencia. Vitamina A USP, retinil acetato en aceite de algodón equivalente a 30 mg de retinol/g de aceite.

- 7.1.6 Preparación de la muestra
- 7.1.6.1 Pesar 100 mg de muestra y transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 ml. Adicionar un ml de agua, tapar y agitar circularmente. Adicionar 30 ml de solución extractante, tapar y agitar circularmente por un minuto.
- 7.1.6.2 Saponificación.- Tomar una alícuota de un ml de la solución metanólica de KOH y adicionar al matraz de 100 ml que contiene el extractante con la vitamina, agitar un minuto. Calentar la muestra por 30 min en un baño de agua calibrado a 55°C. Tapar el matraz para evitar pérdida de solventes o bien utilizar un condensador de aire y colocarlo en la boca del matraz. Enfriar y dejar reposar una hora en la obscuridad; posteriormente adicionar 30 ml de hexano y aforar con la solución de sulfato de sodio, agitar vigorosamente. Dejar reposar por una hora antes de realizar la determinación. La fase orgánica es de 50 ml.
- 7.1.6.3 Solución de estándar de vitamina A
- Del material de referencia (Vitamina USP), tratar de la misma manera que la muestra la cantidad necesaria para obtener una solución con una concentración de 3, 000 UI/ml.
  - De la solución del punto anterior transferir 0,2 ml a un matraz volumétrico de 10 ml, evaporar a sequedad con nitrógeno. Disolver el residuo con metanol HPLC, completar el volumen y homogenizar. La solución resultante tiene una concentración de 60 UI/ml.
- 7.1.6.4 Cuantificación cromatográfica.- Operar el cromatógrafo de líquidos bajo las siguientes condiciones:
- Longitud de onda 325 nm;
  - Flujo 0,75 ml/min;
  - Inyectar al cromatógrafo 20 µl de la solución estándar, y
  - De la muestra, evaporar una alícuota de la fase orgánica superior y evaporar a sequedad bajo corriente de nitrógeno. Disolver el residuo en metanol HPLC suficiente para tener una concentración de 60 UI/ml. La vitamina se cuantifica comparándola con el estándar inyectando al cromatógrafo 20 µl.
- 7.1.7 Cálculos

La concentración de vitamina A se cuantifica mediante la ecuación:

$$[\text{vit A}] = \frac{h_w \times [\text{std}] \times f}{h_{\text{std}} \times w}$$

donde:

$h_w$  es la altura de la señal de la muestra;  
 $[\text{std}]$  es la concentración del estándar;  
 $f$  es el factor de dilución;  
 $h_{\text{std}}$  es la altura de la señal del estándar, y  
 $w$  es el peso de la muestra.

## 7.2 Determinación de vitamina A acetato. Método HPLC en fase normal

### 7.2.1 Principio

Romper la cubierta de la Vitamina A acetato con ácido clorhídrico 0,1 N, disolviendo en etanol absoluto, extraer con n-hexano e inyectar en un equipo de HPLC y leer a una longitud de onda de 325 nm.

### 7.2.2 Equipo

- Baño de ultrasonido con control de temperatura;
- Agitador mecánico;
- Membranas millipore tipo fh 0,5  $\mu\text{m}$ ;
- Filtros millipore 0,45  $\mu\text{m}$ , y
- Sistema de filtración millipore.

#### 7.2.2.1 Sistema cromatográfico (HPLC)

- Bomba;
- Integrador, y
- Detector.

#### 7.2.2.2 Condiciones

- Fase estacionaria: lichrosorb si 60 (5 $\mu\text{m}$ ), Columna preempacada de acero inoxidable 250 mm x 4 mm d.i.
- Fase móvil
- n-hexano/dioxano 97:3



- Velocidad de flujo: 1,0 ml/min
- Longitud de onda: 325 nm
- Volumen de inyección: 20 µl

#### 7.2.3 Reactivos

- Ácido clorhídrico 0,1 N;
- Ácido clorhídrico 0,01 N;
- Etanol absoluto;
- n-hexano HPLC;
- Dioxano HPLC, y
- Estándar de referencia: Usar un estándar secundario valorado de Vitamina A acetato 500 CWS.

#### 7.2.4 Procedimiento

##### 7.2.4.1 Preparación de la fase móvil

Mezclar con probeta en un vaso de precipitados de 1 000 ml; 970 ml de n-hexano y 30 ml de dioxano, mezclar bien, filtrar a través de membrana millipore fh de 0,5 µm y desgasificar durante 3 min en ultrasonido.

##### 7.2.4.2 Preparación de la solución estándar (por duplicado)

- a) Pesar con exactitud 500 mg de vitamina A acetato 500 en un matraz volumétrico de 100 ml.
- b) Adicionar 20 ml de ácido clorhídrico 0,1 N.
- c) Colocar en un baño ultrasónico por 10 min a una temperatura de 60°C.
- d) Enfriar y aforar con etanol absoluto en un matraz volumétrico de 100 ml adicionar con pipeta volumétrica 25 ml de n-hexano y 17 ml de solución de ácido clorhídrico 0,01N.
- e) Adicionar con pipeta volumétrica al matraz anterior 25 ml de la solución estándar (en etanol).
- f) Agitar mecánicamente durante 10 min.
- g) Dejar reposar 10 min.
- h) Tomar una alícuota de 3 ml de la fase orgánica (superior) y llevarla a un matraz volumétrico de 50 ml, disolver y aforar con n-hexano HPLC.

- i) Tomar una alícuota de 1 ml de la solución anterior y llevarla a un matraz volumétrico de 50 ml, disolver y aforar con n-hexano HPLC.
- j) Al momento de inyectar filtrar a través de acrodisc de 0,45 µm.
- k) Concentración del estándar: 3,0 UI/ml.

#### 7.2.4.3 Preparación de la solución muestra

- Repetir el mismo procedimiento que para la preparación de la solución estándar.
- Linealidad del método: 1,6 a 6,0 UI/ml.
- Inyección del estándar y la muestra: Dejar estabilizar el sistema con la fase móvil al flujo indicado durante aproximadamente 30 min, se inyecta por triplicado cada uno de los estándares hasta obtener un CV ≤ 2 % para la adecuación del sistema y posteriormente se inyecta la muestra.

#### 7.2.5 Evaluación

Evaluación por área o altura. Método de estándar externo.

El cálculo se realiza considerando un coeficiente de variación ≤ 2 % entre el área o altura de los estándares.

##### 7.2.5.1 Cálculos

Las áreas o alturas resultantes de los picos en la muestra se comparan con los picos de la solución estándar.

$$\text{MUI/kg de vitamina A acetato} = [(A_{pb}) (C_{std}) / (A_{std}) (W_{pb})] [Fd \times 1\ 000]$$

donde:

$A_{pb}$  es la altura o área del pico de la solución problema;  
 $A_{std}$  es la altura o área del pico de la solución estándar;  
 $W_{pb}$  es el peso de la muestra en g;  
 $C_{std}$  es la concentración de la solución estándar, en UI/ml, y  
 $Fd$  es el factor de dilución (aforos/alícuotas).

### 7.3 Determinación de vitamina A por espectroscopía UV-VIS

#### 7.3.1 Alcance

El método es aplicable para determinar Vitamina A en muestras de Vitaminas: A500, A1000, A/D3 1000/200.

#### 7.3.2 Principio

Se basa en la saponificación del aceite (acetato o palmitato) con hidróxido de potasio, la extracción con éter etílico, y la medición de la absorbancia de luz ultravioleta a través de una dilución con isopropanol puesta en una celda de cuarzo a una longitud de onda de 325 nm.

Tiempo requerido: 2 h para una muestra por triplicado.

#### 7.3.3 Reactivos y materiales

- Refrigerantes para reflujo;
- Espátula de acero inoxidable;
- Matraces redondos de fondo plano y entrada esmerilada 24/40 de 125 ml;
- Matraces volumétricos de 100 ml y 250 ml color ámbar;
- Embudos de separación con llave de teflón de 250 ml color ámbar;
- Pipetas volumétricas de 5 ml, 10 ml y 25 ml;
- Probetas de 50 ml y 250 ml;
- KOH acuoso 9/10 solución (P/P);
- Eter Etílico grado p.a.;
- 2-propanol (Isopropanol) grado espectrofotométrico;
- Etanol grado p.a.;
- Nitrógeno grado industrial;
- Agua destilada o desionizada;
- Cloruro de sodio grado p.a., y
- Celdas de cuarzo para espectrofotómetro de 10 mm de espesor.

#### 7.3.4 Instrumentos y equipo

- Balanza analítica con precisión 0,1 mg;
- Espectrofotómetro UV-VIS rango 190 nm - 750 nm;
- Mantillas de calentamiento;
- Unidad de control de temperatura, y
- Campana de extracción.

- 7.3.5 Descripción de la actividad (Realizar por triplicado)
- 7.3.5.1 Para Vitamina A con nivel esperado de 500,000 UI/g a 600,000 UI/g, pesar con precisión de 0,1 mg una cantidad entre 45 mg - 55 mg de la muestra en un matraz redondo de 125 ml. Para Vitamina A con nivel esperado de 1'000,000 UI/g a 1'200,000 UI/g pesar con precisión de 0,1 mg una cantidad entre 20 mg – 30 mg de la muestra en un matraz redondo de 125 ml.
- 7.3.5.2 Adicionar con pipeta volumétrica 25 ml de etanol dejándolo resbalar por las paredes del matraz.
- 7.3.5.3 Adicionar 3 ml de KOH solución 9/10.
- 7.3.5.4 Adicionar con pipeta volumétrica 5 ml de etanol dejando resbalar por las paredes del matraz.
- 7.3.5.5 Reflujar durante 30 min bajo un ligero flujo de nitrógeno de 225 NI/h - 250 NI/h (Rotámetro 200 NI/h a 250 NI/h, NI = Unidades de nitrógeno).
- 7.3.5.6 Enfriar a temperatura ambiente sumergiendo los matraces en un baño de agua fría.
- 7.3.5.7 Lavar a través del refrigerante con 30 ml de agua destilada o desionizada.
- 7.3.5.8 Transferir cuantitativamente a un embudo de separación y hacer de 3 a 4 lavados con 150 ml de éter etílico distribuidos en estos lavados y bajo una ligera atmósfera de nitrógeno.
- 7.3.5.9 Agitar durante 3 min venteando esporádicamente para evitar sobrepresión.
- 7.3.5.10 Dejar reposar de 3 min - 5 min a que se separen las fases acuosa y orgánica.
- 7.3.5.11 Desechar la fase acuosa (fase inferior) sobre un vaso de precipitados.
- 7.3.5.12 Hacer una segunda extracción adicionando una punta de espátula de NaCl y 50 ml de agua destilada o desionizada agitando durante 30 s y venteando esporádicamente.
- 7.3.5.13 Dejar reposar de 3 min a 5 min a que se separen las fases y desechar nuevamente la fase acuosa (fase inferior).

- 7.3.5.14 Transferir cuantitativamente la fase orgánica (fase superior) a un matraz volumétrico de 250 ml color ámbar, lavar el interior del embudo y aforar con éter.
- 7.3.5.15 Agitar el matraz y tomar una alícuota de 10 ml y transferir a un matraz ámbar volumétrico de 100 ml (que contenga isopropanol a aproximadamente la mitad de su volumen) y aforar con isopropanol.
- 7.3.5.16 Agitar el matraz y leer la extinción de la muestra a 325 nm en el espectrofotómetro UV-VIS, utilizando isopropanol como blanco y llevando a cero a 325 nm.
- 7.3.6 Cálculos

$$\text{Contenido de vitamina A (UI/G)} = \frac{[E(325)](25)(1\ 830)}{\text{PM}}$$

donde:

E(325) es la extinción de la muestra a 325 nm;  
25 es el factor de dilución;  
1 830 es el factor de cálculo de extinción específica medida, y  
PM es el peso de la muestra en g.

Los valores de las tres determinaciones no deben exceder de un 1 % entre los valores obtenidos para considerar el promedio de los mismos. En caso contrario deberá repetirse el análisis.

#### 7.4 Determinación de vitamina A por espectrofotometría

##### 7.4.1 Campo de aplicación

Este método puede emplearse en muestras que contengan al menos 250,000UI/g de vitamina A sintética.

##### 7.4.2 Principio

El contenido de vitamina A es determinado por espectrofotometría a 325 nm después de una extracción con hexano de una muestra saponificada.

#### 7.4.3 Seguridad

Usar guantes y lentes de protección. Realizar el análisis en una campana de extracción.

#### 7.4.4 Reactivos

Todos los reactivos deben ser de grado analítico y el agua debe ser destilada o de calidad equivalente.

- Nitrógeno (utilizar con una presión de 0,2 bar);
- Solución de hidróxido de potasio 50 % m/m;
- Etano;
- Hexano, y
- 2-propanol.

#### 7.4.5 Aparatos

- Equipo y material regular de laboratorio;
- Equipo de cristal;
- Baño de agua con termostato;
- Espectrofotómetro de UV/ visible, y
- Celda de cuarzo con 1 cm de longitud.

#### 7.4.6 Procedimiento

##### 7.4.6.1 Comentarios

Todas las manipulaciones deben ser llevadas a cabo lo mas rápido posible, evitando la exposición a la luz y a agentes oxidantes. Trabajar en ambiente con nitrógeno de ser posible.

##### 7.4.6.2 Extracción

7.4.6.2.1 Pesar 150 mg de una muestra de Vitamina A 1,000,000 UI/g (mE) con una precisión de 0,1 mg y transferirla a un matraz de Koch.

7.4.6.2.2 Agregar en el orden siguiente:

- 2 ml de agua tibia medidos con una pipeta graduada (35°C aprox.);
- 25 ml de etanol;
- 3 ml de la solución de hidróxido de potasio 50 %;
- Colocar en un condensador de aire y mantener en reflujo en un baño con agua por 20 min a temperatura de 35°C;

- Enfriar en agua corriente y remover el condensador;
- Agregar 30 ml de agua a la muestra;
- Extraer con 15 ml de hexano y guardar el extracto en un matraz volumétrico de 100 ml. Repetir 5 veces;
- Completar hasta la marca con hexano;
- Homogenizar. Esta es la solución 1, y
- Tomar exactamente 1 ml de la solución 1 y diluirla con 2-propanol en un matraz volumétrico 100 ml para obtener una solución que contenga alrededor de 15 UI/ml de vitamina A. Esta es la solución 2.

#### 7.4.6.3 Determinación

Medir la absorbancia de la solución 2,  $A_E$ , contra la absorbancia del solvente, (2-propanol).

#### 7.4.6.4 Cálculo

$$E^{1\%}_{1\text{cm}} = \frac{A_E * 100 * V_2}{100 * V_1 * m_E * l}$$

$$\text{Contenido de vitamina A en UI/g} = E^{1\%}_{1\text{cm}} * 1\ 830$$

donde:

mE	es el peso del producto en gramos;
$A_E$ :	es la absorbancia de la solución 2;
$V_1$	es el volumen de la solución 1 en ml;
$V_2$	es el volumen de la solución 2 en ml;
100	es el volumen de la solución 1 en ml;
$E^{1\%}_{1\text{cm}}$	es la extinción de 1 % de la solución de análisis examinada bajo una celda de 1 cm de grosor;
1 830	es el coeficiente de conversión de la vitamina A alcohol en UI/g, y
l	es la longitud de la celda = 1 cm.

## 8 ESTABILIDAD

La que garantice el fabricante en la etiqueta.

**9                    MARCADO, ETIQUETADO, ENVASE, EMPAQUE Y EMBALAJE**

El producto objeto de la aplicación de esta norma debe cumplir con lo establecido en la norma oficial mexicana NOM-ZOO-012 (ver 2 Referencias).

**10                    ALMACENAMIENTO**

Debe ser en lugares frescos, secos y protegidos de la luz.

**11                    BIBLIOGRAFÍA**

NOM-008-SCFI-2002                    Sistema general de unidades de medida, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 27 de noviembre de 2002.

AOAC INTERNACIONAL, 16th edición volumen II, capítulo 45 Poultry Science 1995, 74:407-411

Hoffmann la Roche LTD, Basilea, Suiza.

**12                    CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES**

Esta norma mexicana no es equivalente a ninguna norma internacional por no existir referencia alguna al momento de su elaboración.

**México D.F., a**

**MIGUEL AGUILAR ROMO.  
DIRECTOR GENERAL.**

**AVA/AFO/DLR/MRG.**