

NMX-Y-227-SCFI-2006

**ALIMENTOS PARA ANIMALES – DETERMINACIÓN DE
CAROTENOIDES TOTALES POR CROMATOGRFÍA EN
COLUMNA EN ALIMENTOS E INGREDIENTES PARA ANIMALES
– MÉTODO DE PRUEBA (CANCELA A LA NMX-Y-227-1990)**

**ANIMAL FEED – TOTAL DETERMINATION OF CAROTENOIDS
BY COLUMN CROMATOGRAPHY – TEST METHOD**

PREFACIO

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

- AGRIBRANDS PURINA MÉXICO, S.A. DE C.V.
- AGROPECUARIA LA FORTUNA, S.A. DE C.V.
- BASF MEXICANA, S.A. DE C.V.
- CÁMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS PECUARIOS BALANCEADOS, A.C.
- CÁMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA DE TRANSFORMACIÓN
Sección de Fabricantes de Alimentos Balanceados para Animales;
- CENTRO DE CONTROL AGROINDUSTRIAL, S.A.
- COMITÉ TÉCNICO DE NORMALIZACIÓN NACIONAL DE ALIMENTOS PARA ANIMALES
- COMITÉ TÉCNICO DE NORMALIZACIÓN NACIONAL DE PRODUCTOS AGRÍCOLAS, PECUARIOS Y FORESTALES
- LABORATORIO DE CONSTATAción AGROINDUSTRIAL, S.A. DE C.V.
- MALTA TEXO DE MÉXICO, S.A. DE C.V.
- PILGRIM'S PRIDE, S.A. DE C.V.
- SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN
Dirección General de Fomento a la Agricultura.



SECRETARIA DE
ECONOMIA

**ALIMENTOS PARA ANIMALES – DETERMINACIÓN DE
CAROTENOIDES TOTALES POR CROMATOGRFÍA EN
COLUMNA EN ALIMENTOS E INGREDIENTES PARA ANIMALES
– MÉTODO DE PRUEBA (CANCELA A LA NMX-Y-227-1990)**

**ANIMAL FEED – TOTAL DETERMINATION OF CAROTENOIDS
BY COLUMN CROMATOGRAPHY – TEST METHOD**

1 OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Esta norma mexicana establece el método para la determinación de carotenoides totales en productos del género *Capsicum* (esterificados y libres) por cromatografía en columna.

Esta norma mexicana es aplicable a productos naturales rojos.

2 FUNDAMENTO

Este método se basa en la determinación espectrofotométrica de carotenoides totales saponificados separados por cromatografía en columna.

3 MATERIAL Y EQUIPO

- Balanza analítica con sensibilidad 0,000 1 g;
- Espectrofotómetro;
- Equipo de filtración al vacío;
- Bureta de 50 cm³;
- Matraces volumétricos de 100 cm³;
- Pipetas volumétricas de 10 cm³, y
- Columnas cromatográficas de vidrio: 12.5 mm de diámetro interior por 30 cm de longitud, con un tubo capilar en la descarga de 2 mm de diámetro interno por 10 cm de longitud, para introducir en el cuello de un matraz volumétrico de 25 cm³.

4 REACTIVOS

- Solución extractante: hexano-acetona-alcohol etílico-tolueno (10:7:6:7).
- Solución acuosa de sulfato de sodio anhidro al 10 %. Disolver 10 g de sulfato de sodio anhidro en 100 cm³ de agua destilada.
- Solución metanólica de hidróxido de potasio al 40%. Disolver 40 g de hidróxido de potasio en 100 cm³ de metanol.
- Absorbente.- Mezclar perfectamente cantidades iguales en peso de sílica gel y tierra diatomácea sometidos a 150°C durante 16 h.
- Reactivo de sudán I
 - Solución patrón 1,0 milimolar: recristalizar el sudán usando alcohol etílico absoluto caliente.
 - Secar los cristales a peso constante en estufa de vacío a 70°C , disolver 0,124 1 g en 500 cm³ de acetona-isopropanol (1:1).
 - Solución de trabajo 0,04 milimolar: diluir una alícuota de 20 cm³ de la solución patrón a 500 cm³ con acetona-isopropanol (1:1). Almacenar en la obscuridad.
- Obtención del factor de desviación del espectrofotómetro. Calibrar el espectrofotómetro de acuerdo al instructivo del mismo y con la solución de trabajo de sudán I se debe obtener una lectura de 0,561 a 474 nm y otra de 0,460 a 436 nm. De no ser así, obtener el factor de desviación del aparato (f) con el siguiente cálculo:

$$f_1 = \frac{0,561}{\text{Absorbancia obtenida a 474 nm}}$$

$$f_2 = \frac{0,460}{\text{Absorbancia obtenida a 436 nm}}$$

NOTA.- Se deben utilizar celdillas de 1 cm por lado.

- Eluentes:
 - Hexano para betacaroteno.
 - Hexano-acetona 60:40 para xantofilas amarillas.
 - Metanol para xantofilas rojas.

NOTA.- Utilizar solventes de alta pureza.

5 PROCEDIMIENTO

- Moler la muestra para que pase a través de un tamíz No. 40.
- Pesar la muestra de acuerdo con el siguiente cuadro en un matraz volumétrico de 100 cm³.

Concentración de la muestra (g/Kg).	Peso de la muestra (g).
0,5-5,0	2,0
5,1-10,0	1,0
10,1-40,0	0,5

- Adicionar 30 cm³ de la solución extractante. Dejar reposar 16 horas en la obscuridad y aforar a 100 cm³ con la misma solución.
- Tomar una alícuota de 10 cm³ con pipeta volumétrica, transferirla a un matraz volumétrico de 100 cm³.
- Adicionar 20 cm³ de extractante medido con bureta y 2 cm³ de solución de hidróxido de potasio al 40%.
- Dejar reposar durante 1 h en la obscuridad.

- Adicionar 30 cm³ de hexano medido con bureta, aforar con solución de sulfato de sodio al 10 %. Agitar vigorosamente durante un minuto, dejar reposar en la obscuridad durante 1 h. La fase superior debe ser de 50 cm³.
- Secar perfectamente la columna de cromatografía, conectarla al equipo de filtración al vacío y tapar el fondo con una pequeña capa de algodón. Adicionar el absorbente hasta una altura aproximada de 12 cm, compactarlo aplicando lentamente el vacío para que la columna quede empacada en forma homogénea, con una altura aproximada de 7 cm. Colocar una capa de 2 cm de sulfato de sodio anhidro sobre el empaque y comprimir fuertemente, hacer pasar 20 cm³ de hexano a través del soporte y desde este momento en adelante no permitir que la columna quede sin eluyente. Ajustar el vacío para tener un flujo de 2 a 3 gotas por segundo (una válvula de aguja en la línea ayuda a controlarlo).
- Colocar matraces volumétricos de 25 cm³ bajo la columna cromatográfica como receptores de las diferentes fracciones carotenoides.
- Tomar una alícuota de 10 cm³ de la fase superior de la muestra extraída y depositarla suavemente en la parte superior de la columna y eluir.
- Para betacaroteno adicionar 25 cm³ de hexano y eluir, recolectar en el matraz, desconectar el vacío y aforar con el mismo eluyente y mezclar por inversión. Dejar en la obscuridad a temperatura ambiente.
- Xantofilas amarillas. Después de la separación de los carotenos, bajar la siguiente fracción adicionando hexano-acetona. Cuando haya eluido totalmente desconectar el vacío, retirar el matraz aforando con el mismo eluyente y mezclar por inversión. Dejar en obscuridad a temperatura ambiente.
- Xantofilas rojas. Después de la separación de las xantofilas amarillas separar las xantofilas rojas con metanol. Cuando se complete la elución, desconectar el vacío, retirar el matraz, aforar con el mismo eluyente y mezclar por inversión. Dejar en la obscuridad a temperatura ambiente.
- Medir rápidamente la absorbancia de cada una de las fracciones recolectadas ajustando previamente con el mismo eluyente el espectrofotómetro. A 436 nm para betacaroteno, 447nm para xantofilas amarillas y a 474 para xantofilas rojas.

La absorbancia debe quedar comprendida entre 0,25 y 0,75 unidades, de no ser así, repetir el análisis modificando el peso de muestra.

6 CÁLCULOS.

Para betacaroteno:

$$X \text{ g/Kg} = \frac{A_{436} \times f \times FD}{W \times 196}$$

Para xantófila amarillas:

$$Y \text{ g/Kg} = \frac{A_{447} \times f \times FD}{W \times 250}$$

Para xantofilas rojas:

$$Z \text{ g/Kg} = \frac{A_{474} \times f \times FD}{W \times 215}$$

donde:

W= Peso de la muestra en gramos;

A₄₃₆= Absorbancia de betacaroteno a 436 nm;

A₄₄₇= Absorbancia de xantofilas amarillas a 447 nm;

A₄₇₄ = Absorbancia de xantofilas rojas a 474 nm;

196= Coeficiente de extinción para betacaroteno a 436 nm;

250= Coeficiente de extinción para xantofilas amarillas a 447 nm;

215= Coeficiente de extinción para xantofilas rojas a 474 nm;

FD = Factor de dilución, y

f= Factor de desviación del espectrofotómetro.

Una vez que se tengan los valores individuales

$$CT = X + Y + Z$$

CT= Concentración total de carotenoides.

7 BIBLIOGRAFÍA

NOM-008-SCFI-2002	Sistema General de Unidades de Medida, publicada en el Diario Oficial de la Federación el día 27 de noviembre de 2002.
NMX-Y-227-1990	Alimentos para animales - (género capsicum) - Determinación de carotenoides totales - Cromatografía en columna. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 31 de julio de 1990.
NMX-Z-013-1977	Guía para la redacción, estructuración y presentación de las Normas Mexicanas. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 31 de octubre de 1977.
Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis, method 970.64.	

8 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**

RCG/DLR.