

NMX-Y-229-SCFI-2006

**ALIMENTOS PARA ANIMALES – DETERMINACIÓN DE
XANTOFILAS SAPONIFICADAS TOTALES EN FLOR DE
CEMPAZUCHIL (género Tagetes) – MÉTODO DE PRUEBA
(CANCELA A LA NMX-Y-229-1990)**

**ANIMAL FEED – CEMPAZUCHIL (Tagetes genus) TOTAL
SAPONIFIED XANTHOPHYLLS DETERMINATION – 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.
- AGRÍCOLA E INDUSTRIAL SILAO, S.A. DE C.V.
- AGROPECUARIA LA FORTUNA, S.A. DE C.V.
- ASOCIACIÓN MEXICANA DE ESPECIALISTAS EN NUTRICIÓN ANIMAL, A.C.
- BASF MEXICANA, S.A. DE C.V.
- CÁMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA DE TRANSFORMACIÓN
Sección de Fabricantes de Alimentos Balanceados para Animales;
- CENTRO DE CONTROL AGROINDUSTRIAL, S.A. DE C.V.
- COMITÉ TÉCNICO DE NORMALIZACIÓN NACIONAL DE ALIMENTOS PARA ANIMALES
- COMITÉ TÉCNICO DE NORMALIZACIÓN NACIONAL DE PRODUCTOS AGRÍCOLAS, PECUARIOS Y FORESTALES
- FLAGA, S.A. DE C.V.
- INDUSTRIAS ALCOSA, S.A. DE C.V.

- INVESTIGACIÓN APLICADA, S.A.
- LA HACIENDA, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO DE CONSTATACIÓN AGROINDUSTRIAL, S.A. DE C.V.
- LABORATORIOS BIOQUIMEX, S.A. DE C.V.
- MALTA TEXO DE MÉXICO, S.A. DE C.V.
- NUTRICIÓN PLANIFICADA, S.A. DE C.V.
- PILGRIM'S PRIDE, S.A. DE C.V.
- PRODEMEX, S.A. DE C.V.
- PRODUCTOS ROCHE, 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
XANTOFILAS SAPONIFICADAS TOTALES EN FLOR DE
CEMPAZUCHIL (género Tagetes) – MÉTODO DE PRUEBA
(CANCELA A LA NMX-Y-229-1990)**

**ANIMAL FEED – CEMPAZUCHIL (Tagetes genus) TOTAL
SAPONIFIED XANTHOPHYLLS DETERMINATION – TEST
METHOD**

1 OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Esta norma mexicana establece el método para la determinación de xantofilas saponificadas y el porcentaje de saponificación por cromatografía en columna.

Esta norma mexicana es aplicable a flor de cempazuchil y sus derivados.

2 FUNDAMENTO

Este método se basa en la determinación espectrofotométrica de las xantofilas totales saponificadas presentes en la muestra después de haberlas separado por cromatografía en columna.

3 MATERIAL Y EQUIPO

- Balanza analítica, sensibilidad 0,000 1 g;
- Espectrofotómetro;
- Matraces volumétricos;
- Baño maría;
- Refrigerante de cobre;
- Equipo de filtración al vacío;
- Columnas cromatográficas de vidrio de 12,5 mm de diámetro interno 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.
- Pipetas volumétricas.
- Bureta de 50 cm³.
- Piceta.

4 REACTIVOS

- Acetona anhidra;
- Hexano;
- Solución extractante: Hexano - acetona - alcohol etílico - tolueno (10:7:6:7) Nota: utilizar solventes de alta pureza.
- Hidróxido de potasio en solución metanólica al 40 %. Disolver con alcohol metílico, 400 g de hidróxido de potasio en un matraz volumétrico de 1 000 cm³, enfriar y aforar.
- Solución acuosa de sulfato de sodio anhidro al 10 %: Disolver con agua destilada, 100 g de sulfato de sodio anhidro en un matraz volumétrico de 1 000 cm³ y aforar.
- Absorbente: Mezclar perfectamente cantidades iguales en peso de sílica gel G y tierra de diatomeas.
- Eluentes:
 - Carotenos: Hexano - acetona (96:4).
 - Monohidroxipigmentos (MHP): Hexano - acetona (90:10).
 - Dihidroxipigmentos (DHP): Hexano - acetona (80:20).
- Solución concentrada de sudán I. (1-fenilazo-2 naftol). Solución patrón 1,0 milimolar: Recristalizar el sudán empleando etanol absoluto caliente, secar los cristales en la estufa de vacío a 70°C. Disolver con una mezcla de acetona-isopropanol (1:1) 0,124 1 g de sudán en un matraz volumétrico de 500 cm³, aforar y guardar protegiéndolo de la luz.

- Solución de trabajo 0,04 milimolar. Pasar 20 cm³ de la solución patrón a otro matraz volumétrico de 500 cm³ y aforar con acetona-isopropanol (1:1).
- Con la solución de trabajo del sudán I calibrar el espectrofotómetro para obtener una lectura de 0,561 a una longitud de onda de 474 nm.
- La desviación del espectrofotómetro se debe corregir utilizando el factor obtenido al dividir $\frac{0,561}{\text{densidad óptica del sudán encontrada a 474 nm}}$

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

5 PROCEDIMIENTO

- Moler la muestra para que pase a través de un tamiz No. 40.
- Pesar la muestra en un matraz volumétrico de 100 cm³, de acuerdo al cuadro de concentraciones que a continuación se presenta:

Concentración (mg / kg)	Peso de muestra (mg)
Mayor de 40 000	100
20 001 a 40 000	250
501 a 20 000	500

- 5.1 Para el análisis de la muestra sin saponificar, adicionar 30 cm³ del extractante medido con bureta, tapar y agitar en redondo durante un minuto (en caso de muestras sólidas mantener la mezcla en la oscuridad alrededor de 16 h).
- Agregar 30 cm³ de hexano, aforar con solución de sulfato de sodio al 10 %.
 - Agitar vigorosamente durante un minuto.
 - Dejar reposar en la oscuridad durante una hora antes de efectuar la determinación. La fase superior es de 50 cm³.
- 5.2 Para el análisis de la muestra a saponificar, adicionar 30 cm³ del extractante medido con bureta, tapar y agitar en redondo durante un minuto (en caso de muestras sólidas mantener la mezcla en la oscuridad alrededor de 16 h)
- Agregar 2 cm³ de solución de hidróxido de potasio al 40 %, tapar, agitar en redondo por un minuto, y llevar a baño maría a 56°C durante 20 min evitando pérdida de disolvente (utilizar un refrigerante o tubo de cobre cubierto con algodón húmedo o tapado).

- Enfriar la muestra y dejar reposar una hora en la oscuridad. Agregar 30 cm³ de hexano y aforar con solución de sulfato de sodio al 10 %. Agitar vigorosamente durante un minuto, dejar reposar en la oscuridad mínimo una hora o hasta clarificación total de la fase superior.

NOTA.- Las lecturas de absorbancia deberán estar en un intervalo de 0,25 a 0,75.

- 5.3 Tapar el fondo de la columna con una mota de algodón, adicionar una capa de aproximadamente 12 cm del absorbente, conectar al sistema de vacío en operación para compactar. Completar el empaque de la columna para alcanzar una altura de 7 cm. Colocar una capa de 2 cm de sulfato de sodio anhidro sobre el empaque y comprimir fuertemente. Para activar la columna hacer pasar 20 cm³ de hexano y no permitir que quede sin eluente.

Carotenos totales

- Colocar como receptor bajo la columna cromatográfica un matraz volumétrico de 25 cm³, tomar una alícuota de 2 cm³ a 4 cm³ del extracto de la muestra (La separación en columna se llevará a cabo paralelamente tanto para la muestra sin saponificar 5.1 como para la muestra saponificada 5.2), ajustar el vacío para tener un flujo de 2 a 3 gotas por segundo. Una válvula de aguja en la línea de vacío ayuda a controlar el flujo.

Para quien no cuente con el sistema de filtración, puede utilizar presión positiva proporcionada por nitrógeno regulado para obtener el flujo requerido.

- Agregar gradualmente 25 cm³ del eluente para carotenos, hexano - acetona (96:4), tan pronto como la última porción del extracto entre al empaque. Desconectar el vacío o la presión después de que la banda de carotenos se haya colectado en el matraz.
- Retirar el matraz y aforar con el eluente para carotenos y homogeneizar.
- Dejar la solución de carotenos en la oscuridad a temperatura ambiente.
- Medir la absorbancia a 436 nm rápidamente, ajustando el espectrofotómetro previamente con hexano - acetona (96:4).

Xantofilas

- Después de la elución de los carotenos, las xantofilas permanecen retenidas en la columna. Para recibir las colocar un matraz volumétrico de 25 cm³ bajo la columna cromatográfica como receptor.

Monohidroxipigmentos (MHP)

- Agregar el eluyente hexano - acetona (90:10) a la columna.
- Cuando se complete la elución de la banda de monohidroxipigmentos, retirar el matraz.
- Aforar con el eluyente para MHP y homogeneizar.
- Dejar la solución de MHP en la oscuridad a temperatura ambiente.
- Medir la absorbancia a 474 nm rápidamente, ajustando el espectrofotómetro previamente con hexano - acetona (90:10).

Dihidroxipigmentos (DHP)

- Agregar el eluyente hexano - acetona (80:20) a la columna.
- Cuando se complete la elución de la banda de dihidroxipigmentos, retirar el matraz.
- Aforar con el eluyente para DHP y homogeneizar.
- Dejar la solución de dihidroxipigmentos en la oscuridad a temperatura ambiente.
- Medir la absorbancia a 474 nm rápidamente, ajustando el espectrofotómetro previamente con hexano - acetona (80:20).

El análisis se debe repetir, modificando el peso de la muestra o la alícuota que se coloca en la columna cromatográfica, si la lectura de xantofilas no queda comprendida entre 0,250 y 0,750 unidades de absorbancia.

6 CÁLCULOS

$$\text{Carotenos g/kg} = \frac{A_{436} \times f}{W \times 196} \times D$$

MHP (Monohidroxipigmentos)

$$\text{MHP mg/Kg} = \frac{A_{474} \times f}{W \times 236} \times D$$

DHP (Dihidroxipigmentos no saponificados y saponificados)

$$\text{DHP mg/Kg} = \frac{A_{474} \times f}{W \times 236} \times D$$

$$\% \text{ Saponificación} = \frac{\text{DHP}_{\text{NS}}}{\text{DHP}_{\text{S}}} \times 100$$

donde:

A_{474} = absorbancia a 474 nm;
236 = absortividad específica para la trans-luteína;
196 = absortividad específica para carotenos;
f = factor de desviación del espectrofotómetro;
W = peso de la muestra en g, y
D = dilución final.

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-229-1990 | Alimentos para animales - Cempasuchil (género tagetes) - Determinación de xantofilas saponificadas 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, 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.