

NMX-Y-262-SCFI-2002

**PRODUCTOS PARA USO AGROPECUARIO - INGREDIENTES
DE ALIMENTOS BALANCEADOS PARA ANIMALES - VITAMINA
D3 - CUANTIFICACIÓN POR CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS
DE ALTA PRESIÓN - MÉTODOS DE PRUEBA (CANCELA A LA
NMX-Y-262-1984)**

**PRODUCTS FOR AGRICULTURAL USE - BALANCED FEED
INGREDIENTS FOR ANIMALS - D3 VITAMIN - HIGH PRESSURE
LIQUID CHROMATOGRAPHIC QUANTIFICATION - TEST
METHODS**

PREFACIO

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

- ASOCIACIÓN 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 NORMALIZACION NACIONAL DE ALIMENTOS PARA ANIMALES
- DEGUSSA HULS MÉXICO, S.A.
- HELM MÉXICO, S.A.
- MALTA TEXO DE MÉXICO, S.A. DE C. V.
- ROCHE VITAMINAS MÉXICO, S.A.



**PRODUCTOS PARA USO AGROPECUARIO - INGREDIENTES
DE ALIMENTOS BALANCEADOS PARA ANIMALES - VITAMINA
D3 - CUANTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS
DE ALTA PRESIÓN - MÉTODOS DE PRUEBA (CANCELA A LA
NMX-Y-262-1984)**

**PRODUCTS FOR AGRICULTURAL USE - BALANCED FEED
INGREDIENTS FOR ANIMALS - D3 VITAMIN - HIGH PRESSURE
LIQUID CHROMATOGRAPHIC QUANTIFICATION - TEST
METHODS**

1 OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Esta norma mexicana establece el método para la cuantificación de la vitamina D3 por cromatografía de líquidos (HPLC).

2 RESUMEN

El polvo seco se disgrega en forma fermentativa. La vitamina liposoluble es extraída con éter de petróleo y trasladada en una solución de Toluol/Heptano.

3 MATERIAL, INSTRUMENTOS Y EQUIPO

3.1 Material

- Matraces redondos color ámbar de 250 ml;
- Matraces erlenmeyer de 250 ml color ámbar esmerilados;
- Embudos de separación color ámbar de 250 ml;
- Embudos de vidrio;
- Pipetas volumétricas de 5 ml, 20 ml y 100 ml;
- Probeta graduada de 100 ml;
- Matraces volumétricos de 25 ml y 50 ml color ámbar;

- Kit de filtración de muestras orgánicas;
- Kit de filtración de solventes HPLC;
- Papel encerado;
- Agua desionizada o tridestilada;
- Enzima pronase o corolase;
- Etanol grado p.a.;
- Eter o bencina de petróleo rango ebullición 60°C – 80°C;
- n-heptano /tolueno p.a. 95/5 V/V;
- n-heptano HPLC;
- Alcohol amílico p.a.;
- Vitamina D3 cristales estándar de referencia 40 MIO UI/g;
- Columna resolve silica 12,5 cm x 5 micras o equivalente, y
- Jeringa de 50 microlitros.

3.2 Instrumentos y equipos

- Balanza analítica con precisión 0,1 mg;
- Rotaevaporador;
- Campana de extracción;
- Sistema HPLC;
- Baño ultrasónico;
- Bomba de vacío, y
- Rotavapor.

4 PROCEDIMIENTO

4.1 Condiciones para la cromatografía

Fase estacionaria	Columna resolve silica 12,5 cm partícula esférica 5 micras
Fase móvil	0,35 % n-pentanol en n-heptano HPLC filtrado y degasificado
Flujo	2 ml/min
Detector	UV-VIS 254 nm
Volúmen de inyección	20 microlitros
Tiempo de corrida	12 min

4.2 Descripción de la actividad

4.2.1 Preparación del estándar

4.2.1.1 Pesar con precisión de 0,1 mg una cantidad que sea entre 50 mg - 50,5 mg del estándar de vitamina D3 cristales sobre un papel encerado.

4.2.1.2 Transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 50 ml color ámbar y aforar con nheptanol/toluol 95/5 y agitar.

- 4.2.1.3 Tomar una alícuota de 5 ml de la solución anterior y transferirla a un matraz volumétrico de 25 ml y aforar con nheptano / tolueno 95/5 y agitar.
- 4.2.1.4 Filtrar para HPLC y depositar en un vial.
- 4.2.1.5 Inyectar 20 microlitros al sistema HPLC y calibrar.
- 4.2.2 Preparación de la muestra (realizar por duplicado).
 - 4.2.2.1 Pesar con precisión de 0,1 mg una cantidad que sea entre 1,5 g – 1,55 g de muestra de vitamina D3 polvo en un matraz Erlenmeyer de 250 ml ámbar.
 - 4.2.2.2 Adicionar con pipeta volumétrica 20 ml de agua desionizada y una punta de espátula de pronase o corolase.
 - 4.2.2.3 Poner en baño maría durante 30 min a 60°C agitando y destapando esporádicamente.
 - 4.2.2.4 Enfriar a temperatura ambiente a chorro de agua.
 - 4.2.2.5 Adicionar con pipeta o probeta 60 ml de etanol.
 - 4.2.2.6 Pasar cuantitativamente con embudo de vidrio a un embudo de separación de 250 ml.
 - 4.2.2.7 Arrastrar los residuos del matraz Erlenmeyer con exactamente 125 ml de éter de petróleo vaciando cuantitativamente al embudo de separación.
 - 4.2.2.8 Agitar en el embudo durante 3 min.
 - 4.2.2.9 Dejar reposar durante 3 min a que se separen las fases.
 - 4.2.2.10 Desechar la fase acuosa (inferior) en un vaso de precipitados.
 - 4.2.2.11 Vaciar la fase orgánica a otro vaso de precipitados de 150 ml.
 - 4.2.2.12 Tomar de esta fase orgánica exactamente 100 ml con pipeta volumétrica y transferir a un matraz redondo ámbar de 250 ml.
 - 4.2.2.13 Separar en el rotaevaporador a una temperatura de 60°C.

- 4.2.2.14 El residuo oleoso que queda en el matraz redondo pasarlo cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 ml con solución de n-heptano / tolueno 95/5 y aforar.
- 4.2.2.15 Filtrar la muestra para HPLC y depositar en un vial.
- 4.2.2.16 Inyectar 20 microlitros en el sistema HPLC después de haber calibrado.

5 CÁLCULOS

En forma manual:

$$RF = \frac{(C)(W1)}{(Ht1)}$$

$$\text{Contenido Vit D3 UI/g} = \frac{(Ht2)(RF)(F)}{W2}$$

donde:

- RF es el factor de respuesta;
- C es la concentración del estándar en UI/g;
- W1 es el peso del estándar en g;
- Ht1 es la altura del pico del estándar;
- Ht2 es la altura del pico de la muestra;
- F es el factor de dilución y alícuotas = 0,134 4, y
- W2 es el peso de la muestra en g.

En forma automática

$$s.a. = \frac{W2}{W1}$$

$$F = 0,134 4$$

donde:

s.a. es la cantidad de muestra.

6 BIBLIOGRAFÍA

NMX-Y-262-1984 Productos para uso agropecuario - Ingredientes de alimentos balanceados - Vitamina D3 - Cuantificación por cromatografía de líquidos de alta presión. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 2 de agosto de 1984.

J. Assoc. off. Anal. Chem. 62 (1979) 1033.

BASF Aktiengesellschaft.- Método de análisis HPLC.- Dr. H. Steverle.-19.01.1981.

7 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.