

NMX-Y-295-SCFI-2003

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

**PRODUCTS FOR AGRICULTURAL USE - BALANCED FEED
INGREDIENTS FOR ANIMALS - VITAMIN E ACETATE -
SPECIFICATIONS AND TEST METHOD**

PREFACIO

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

- ADISSEO, 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.
- ROCHE VITAMINAS MÉXICO, S.A. DE C.V.
- VIMIFOS, S.A. DE C.V.

NMX-Y-295-SCFI-2003



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

PRODUCTS FOR AGRICULTURAL USE - BALANCED FEED INGREDIENTS FOR ANIMALS - VITAMIN E ACETATE - SPECIFICATIONS AND TEST METHOD

1 OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Esta norma mexicana establece las características y métodos de análisis de la vitamina E 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 E Acetato es un producto derivado de compuestos de origen vegetal, los tocoferoles y tocotrienoles. Ambos tocoles consisten de un núcleo de hidroquinona y una cadena de isoprenoide. Debido a razones prácticas, en la nutrición animal se usa el dl- α -tocoferol acetato, en vez de la d- α -tocoferol, que es altamente sensible al oxígeno.

4 CLASIFICACIÓN

La vitamina E puede existir en diferentes formas: dl- α -Tocoferol Acetato y d- α -Tocoferol Acetato.

1 UI de vitamina E = 1 miligramo dl- α -Tocoferol Acetato = 1 unidad de USP

5 ESPECIFICACIONES

La vitamina E acetato en los productos comerciales debe cumplir con las especificaciones y características que se establecen en las tablas 1.

TABLA 1.- Especificaciones y características de la vitamina B1

ESPECIFICACIONES	CARACTERÍSTICAS
Contenido activo	Min. 50 % ó 500 UI/g
Olor	Característico del producto
Color	Blanco a amarillo
Aspecto o presentación	Polvo fino o granular
Solubilidad	Insoluble en agua, poco soluble en grasas y aceites
Algunas presentaciones son hidrodispersables.	Soluble en alcohol, muy soluble en éter, cloroformo y hexano
Peso específico	0,45 g/cm ³ – 0,60 g/cm ³
Pérdida por secado a 105°C / 4h	Máximo 5 %
Tamaño de partícula / granulometría para la vit E hidrodispersable	Mín. 99 % < 0,6 mm ó Mín. 99 % a través de malla No. 35 Mín. 60 % a través de malla No. 100
Tamaño de partícula / granulometría para vit E adsorbato	Mín. 96 % < 0,25 mm ó Mín. 99 % a través de malla No. 35 Mín. 60 % a través de malla No. 100

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).

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 contenido de Vitamina E Acetato Método HPLC en fase normal

7.1.1 Principio

Romper la cubierta de la Vitamina E 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 285 nm.

7.1.2 Equipo

- Baño de ultrasonido con control de temperatura (Telsonic);
- Agitador mecánico;
- Membranas millipore tipo fh 0,5 µm;
- Filtros millipore 0,45 µm nylon, y
- Sistema de filtración millipore.

7.1.3 Sistema cromatográfico (HPLC)

- Bomba;
- Integrador, y
- Detector.

7.1.4 Condiciones

- Fase estacionaria: lichrosorb si 60 (5µm), 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: 285 nm, y
- Volumen de inyección: 20 µl.

7.1.5 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 E acetato oleosa.

7.1.6 Procedimiento

7.1.6.1 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.

7.1.6.2 Preparación de la solución estándar (por duplicado)

- a) Pesar 60 mg – 80 mg de vitamina E acetato oleosa en un matraz volumétrico de 100 ml.
- b) Adicionar 40 ml de n-hexano y colocar en un agitador por 10 min, disolver y aforar con n-hexano.
- c) Tomar una alícuota de 2 ml y transferirla a un matraz volumétrico de 100 ml y aforar con n-hexano.
- d) Al momento de inyectar, filtrar a través de acrodisc de 0,45 μm .
- e) Concentración del estándar: 14,0 mcg/ml.

7.1.6.3 Preparación de la solución de muestra

- a) Pesar 60 mg – 80 mg de muestra en un matraz volumétrico de 100 ml.
- b) Adicionar 20 ml de ácido clorhídrico 0,1 N.
- c) Colocar en un baño ultrasónico por 15 min a una temperatura de 60°C.
- d) Enfriar y aforar con etanol absoluto.

- e) En un matraz volumétrico de 100 ml adicionar con pipeta volumétrica 25 ml de hexano y 17 ml de solución de ácido clorhídrico 0,01N.
- f) Adicionar con pipeta volumétrica al matraz anterior 25 ml de la solución muestra (en etanol).
- g) Agitar mecánicamente durante 10 min.
- h) Dejar reposar 10 min.
- i) Tomar una alícuota de 2 ml y transferirla a un matraz volumétrico de 100 ml y aforar con n-hexano.
- j) Al momento de inyectar filtrar a través de acrodisc de 0,45 µm.
- k) Linealidad del método: 10,0 mcg/ml a 20,0 mcg/ml.

7.1.6.4 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 inyectar la muestra.

7.1.7 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.

7.1.8 Cálculos

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

$$\text{UI/kg de vitamina E Acetato} = \frac{A_{pb} \cdot C_{std}}{A_{std} \cdot W_{pb}} \cdot Fd \times 1\,000$$

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).

7.2 Determinación de concentración de vitamina E en adsorbatos por HPLC

7.2.1 Principio

La muestra se disuelve en metanol, se clarifica y se separa en una fase invertida C-18 con Metanol.

Tiempo requerido: 1,5 h para una muestra por duplicado, 45 min para cada muestra adicional.

7.2.2 Reactivos y materiales

- Matraces volumétricos de 100 ml;
- Embudos de vidrio;
- Loop para HPLC de 20 microlitros;
- Kit de clarificación de solventes acuosos;
- Kit de filtración de muestras orgánicas;
- Viales;
- Papel encerado;
- Columna analítica C-18 3 cm X 3 cm, ó C-18 25 cm 10 micras;
- Jeringa de 50 microlitros;
- Metanol grado HPLC y grado p.a., y
- Vitamina E estándar de referencia.

7.2.3 Instrumentos y equipo

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

7.2.4 Condiciones HPLC

- Fase estacionaria;
- Fase móvil: Metanol HPLC filtrado y degasificado;

- Flujo: 1,0 ml/min;
- Detector: UV-VIS 285 nm;
- Volumen de inyección: 20 microlitros, y
- Tiempo de corrida: 6 min.

7.2.5 Descripción de la actividad

7.2.5.1 Preparación del estándar

7.2.5.1.1 Pesar con precisión de 0,1 mg una cantidad que sea entre 110 mg - 140 mg del estándar de vitamina E en un matraz volumétrico de 100 ml.

7.2.5.1.2 Disolver en el baño ultrasónico y aforar con metanol p.a.

7.2.5.1.3 Filtrar el estándar para HPLC y pasar a un vial.

7.2.5.1.4 Inyectar 20 microlitros al sistema HPLC.

7.2.5.1.5 Calibrar.

7.2.5.2 Preparación de la muestra

7.2.5.2.1 Pesar con precisión de 0,1 mg una cantidad entre 240 mg - 260 mg de la muestra en un papel encerado.

7.2.5.2.2 Transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 ml, disolver y aforar con metanol p.a.

7.2.5.2.3 Filtrar la muestra para HPLC y transferir a un vial.

7.2.5.2.4 Inyectar 20 microlitros al sistema HPLC.

7.2.6 Cálculos

7.2.6.1 Manuales

$$RF = \frac{(A2)}{(P2)}$$

$$\% \text{ Vitamina E} = \frac{(A1)(C)(F)}{(RF) (P1)}$$

donde:

A2 es el área del pico del estándar;
P2 es el peso del estándar en mg;
A1 es la área del pico de la muestra;
C es la concentración del estándar en %;
F es el factor de conversión de Ph Eur- USP = 0,978 6;
RF es el factor de respuesta o factor de calibración, y
P1 es el peso de la muestra en mg.

7.2.6.2 Automático

$$s.a.= \frac{P1}{P2}$$

donde:

s.a. es el tamaño de la muestra.

7.3 Determinación de contenido de vitamina E acetato método cromatografía de gases

7.3.1 Campo de aplicación

Este método puede emplearse en muestras que contengan polvo de acetato de DL-alfa-tocoferol con un contenido mínimo de 25 % absorbido en un soporte inorgánico (silica o silicato).

7.3.2 Principio

El contenido de acetato de DL-alfa-topcoferol es determinado por cromatografía de gases en una columna empacada después de una disolución del acetato en un solvente.

7.3.3 Seguridad

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

7.3.4 Reactivos

- Hexano grado HPLC
- Hexadecil hexadecanoato (estándar interno);
- Dietil éter grado analítico;
- Estándar de acetato de DL-alfa-Tocoferol. También puede emplearse un estándar cuyo contenido haya sido determinado en comparación a un estándar con referencia, y
- Piridina grado analítico almacenada en malla de 4 Å.

7.3.5 Aparatos

- Equipo y material regular de laboratorio;
- Papel filtro con una porosidad de 0,20 μm (por ejemplo Whatman Anotop 10), y
- Cromatógrafo de gases con un detector de flama ionizante, un automuestreador y un integrador electrónico (ver 8 Apéndice normativo A).

7.3.6 Procedimiento

7.3.6.1 Preparación de las soluciones

Solución de estándar interno

Agregar 10 g de hexadecil hexadecanoato en un matraz volumétrico de 1 L, disolver con hexano. Añadir 10 ml de piridina y llevar a volúmen con hexano. Homogenizar.

7.3.6.2 Calibración de solución

Pesar 100 mg del acetato de tocoferol de referencia en un matraz volumétrico de 25 ml, agregar con una pipeta 10,0 ml \pm 0,01 ml de la solución estándar interna, llevar a volúmen con hexano y agitar.

7.3.6.3 Solución de análisis

Pesar 100 mg de la muestra que será analizada con una precisión de 0,1 mg (con contenido aproximado de 200 mg de acetato de tocoferol) en un matraz volumétrico de 25ml.

Agregar 10 ml de dietil éter y dejar reposar por 30 min.

Después de los 30 min, añadir con pipeta graduada 10,0 ml \pm 0,01 ml de la solución estándar interna. Agregar 5 ml de hexano. Homogenizar y filtrar a través de papel filtro con porosidad de 0,20 μm .

7.3.7 Análisis cromatográfico

Inyectar, bajo condiciones descritas en el apéndice normativo A, alternativamente 1 µl de la solución de referencia y 1 µl de la solución de análisis.

Determinar con el integrador las áreas respectivas de los picos correspondientes al acetato de tocoferol y al estándar interno.

7.3.8 Resultados

$$\text{Tocopheryl acetate content \%} = \frac{A_{ISE}}{A_R} \times \frac{A_E}{A_{ISA}} \times \frac{m_R}{m_E} \times C$$

donde:

- m_R es el peso del acetato de tocoferol la solución de calibración;
- C es la referencia del contenido del acetato de tocoferol (%);
- A_R : es la área del pico del acetato de tocoferol obtenida en el cromatograma correspondiente a la solución de calibración;
- A_{ISE} : es el área del pico del estándar interno obtenida en el cromatograma correspondiente a la solución de calibración;
- A_E : es el área del pico del acetato de tocoferol obtenida en el cromatograma correspondiente a la solución de análisis de la muestra ;
- A_{ISA} : es el área del pico del estándar interno obtenida en el cromatograma correspondiente a la solución de análisis , y
- m_E : es el peso de la muestra de la solución de análisis.

7.3.9 Fidelidad

Repetibilidad (desviación estándar): 0,25 %

Reproductibilidad (desviación estándar): 0,50 %

8 APÉNDICES NORMATIVOS

8.1 Apéndice A – Condiciones cromatográficas

Aparato:

Cromatograma 3 700 o equivalente con automuestreador y equipado con sistema de procesamiento y adquisición de información.

Columna:

- longitud: 2 m de vidrio borosilicato
- diámetro interno: 3 mm

Fase estacionaria:

- WHP 80/100 con 3 % de OV 17 (tierra diatomáceas silanizada con dimetildiclorosilano e impregnada con 3 % de polimetilfenilsiloxano)

Detector:

Sensibilidad FID: 10-9 AFS

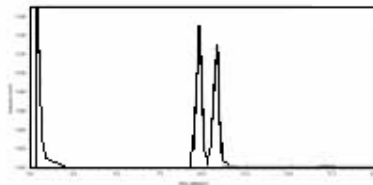
Temperatura:

- Inyector: 290°C
- Detector: 300°C
- Horno: 275°C isoterma
- Gas de acarreo: Nitrógeno (velocidad de flujo 1,8 l/h) pureza mínima 99,999 5 % (Ejemplo: N 55 de aire líquido)

Gases auxiliares:

- Hidrógeno (velocidad de flujo 1,8 l/h) pureza mínima 99,999 5 %
- Aire sintético (velocidad de flujo 18 l/h)
- Cantidad a inyectar: automático 1 µl

8.2 Apéndice normativo B Cromatograma



9 ESTABILIDAD

La que garantiza el fabricante en la etiqueta.

10 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).

11 ALMACENAMIENTO

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

12 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.

Ehjs28mea/EC-H-201, Dr. J. Schneider, BASF AG.

13 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.