

NMX-Y-338-SCFI-2008

**PRODUCTOS PARA USO AGROPECUARIO -
INGREDIENTES DE ALIMENTOS BALANCEADOS PARA
ANIMALES - DETERMINACIÓN DE VITAMINA K3
(Menadiona) EN PREMEZCLAS – ESPECIFICACIONES
Y MÉTODOS DE PRUEBA.**

**PRODUCTS FOR AGRICULTURAL USE -BALANCED
FEED INGREDIENTS FOR ANIMALS – VITAMIN K3
(Menadiona) IN PREMIX**

PREFACIO

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

- BASF MEXICANA S.A. de C.V.

- CAMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA DE TRANSFORMACIÓN.

- COMITÉ TÉCNICO DE NORMALIZACIÓN NACIONAL DE ALIMENTOS PARA ANIMALES

- DSM NUTRITIONAL PRODUCTS MEXICO S.A. de C.V.

ÍNDICE DEL CONTENIDO

Número del Capítulo		Página
1	Objetivo y Campo de Aplicación	1
2	Referencias	1
3	Definición	2
4	Clasificación	2
5	Especificaciones	2
6	Muestreo	3
7	Métodos de prueba	3
8	Marcado, etiquetado, envase, empaque y embalaje	8
9	Almacenamiento	8
10	Vigencia	8
11	Concordancia con Normas Internacionales	8

**PRODUCTOS PARA USO AGROPECUARIO -
INGREDIENTES DE ALIMENTOS BALANCEADOS PARA
ANIMALES - DETERMINACIÓN DE VITAMINA K3
(Menadiona) EN PREMEZCLAS – ESPECIFICACIONES
Y MÉTODOS DE PRUEBA.**

**PRODUCTS FOR AGRICULTURAL USE -BALANCED
FEED INGREDIENTS FOR ANIMALS – VITAMIN K3
(Menadiona) IN PREMIX**

1 OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Esta norma mexicana establece las características y métodos de análisis de la Vitamina K3 en Premezclas Vitamínicas y que puedan o no contener minerales, para ser utilizada como ingrediente en alimentos balanceados para animales.

2 REFERENCIAS

Para la correcta aplicación de esta norma se deben consultar la siguiente norma oficial mexicana y norma mexicana vigentes 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. (Contiene dos modificaciones 03/06/1998 y 27/01/2004), 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 K3 también llamada Menadiona, lo cual quiere decir que se almacena en los tejidos, el hígado y la grasa. Su función más importante la desempeña en el proceso de la coagulación de la sangre, básico para el desarrollo de la vida, relacionada también con el proceso de formación y desarrollo de los huesos y su presencia es imprescindible para la fijación del calcio y para la remineralización.

4 CLASIFICACIÓN

También llamada vitamina de la coagulación, vitamina antihemorrágica y menadiona.

La vitamina K3 pertenece al grupo de las vitaminas liposolubles.

FORMA QUÍMICA

Menadiona Sodio Bisulfito; Menadiona Dimetil Pirimidol Bisulfito; Menadiona Nicotinamida Bisulfito.

5 ESPECIFICACIONES

Las especificaciones que debe cumplir la Vitamina K3 en los productos comerciales para la elaboración de las premezclas vitamínicas para consumo animal se establecen a continuación:

Nombre	Concentración mínima
Menadiona Sodio Bisulfito (MSB ó BSM)	50 – 51%
Menadiona Nicotinamida Bisulfito (MNB ó STAB)	Menadiona 43 – 43,7% Nicotinamida 31 – 31,2%
Menadiona Dimetil Pirimidol Bisulfito (MPB)	23%

6 MUESTREO

Se establece de común acuerdo entre el fabricante y el comprador. A falta de este acuerdo se recomienda seguir las prescripciones indicadas en las normas vigentes (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 VITAMINA K3 EN PREMEZCLAS POR HPLC

7.1.1 ALCANCE

Este método es aplicable para la determinación de Vitamina K3 (Menadiona) en sus tres formas químicas.

7.1.2 PRINCIPIO

La extracción de Vitamina K3 y la conversión a Menadiona libre en medio acuoso, posteriormente se extrae el medio orgánico con NaCO₃, esta solución se inyecta al sistema de HPLC.

7.1.3 EQUIPO

- Molino
- Baño de agua ultrasónico.
- Mezclador de reactivos Vortex
- Sistema HPLC.

7.1.4 REACTIVOS

Solución de carbonato de sodio 2N

7.1.5 CONDICIONES DE TRABAJO.

Fase estacionaria:	Silica gel Lichrosorb Si-60, 5 μ m, MERK
Columna:	Acero inoxidable, longitud 25 cm
Fase móvil:	Hexano-Dioxano 93-7
Velocidad de flujo:	1,0 ml/min
Presión:	110 bares aproximadamente
Temperatura:	Ambiente
Volumen de inyección:	20 μ L
Detección:	254 nm
Tiempo de retención:	5 min

7.1.6 SOLUCIÓN ESTANDAR

Pesar con exactitud alrededor de 15 mg de estándar de Vitamina K3 menadiona, llevarlo a un matraz volumétrico de 250 ml ámbar, disolver con aproximadamente 100 ml de hexano grado cromatográfico, llevar al aforo con éste. Tomar una alícuota de 1 ml y llevarlo a un matraz volumétrico de 100ml ámbar y aforar con hexano grado cromatográfico. Filtrar a través de un filtro de nylon de 0.35 μ m (solución estándar), concentración final de 0.5 μ g/ml, aproximadamente.

7.1.7 PROCEDIMIENTO

Pesar alrededor de 6 g de muestra en un matraz de 200 ml, adicionar 3 terceras partes de agua y agitar mecánicamente por 15 min., aforar con agua destilada.

Tomar una alícuota de 10 ml de la solución acuosa, agregar 20 ml de hexano, más 10 ml de carbonato de sodio 2N.
Agitar mecánicamente por 15 min.

Inyectar el sobrenadante al sistema HPLC.

7.1.8 CÁLCULOS

Los cálculos de área o altura de los picos de Menadiona se suman juntos y se comparan con el pico del estándar de Menadiona considerando el peso de la muestra, la concentración del estándar y la dilución del extracto.

7.2 DETERMINACIÓN DE VITAMINA K3 EN PREMEZCLAS POR HPLC

7.2.1 ALCANCE

El método es aplicable para determinación de Menadiona en premezclas vitamínicas en sus tres formas químicas.

7.2.2 PRINCIPIO

La premezcla se extrae con fase móvil y el extracto es sometido al HPLC, por comparación con una solución estándar tratada similarmente

7.2.3 REACTIVOS Y MATERIALES

- Sal de sodio del ácido 1-heptanosulfónico grado HPLC
- EDTA grado p.a.
- Trietilamina grado p.a.
- Ácido acético glacial grado p.a.
- Metanol grado HPLC
- Menadiona estándar de referencia
- Agua grado HPLC o desionizada
- Matraz volumétrico transparente de 2000 ml
- Matraz volumétrico de 100 y 250 ml color ámbar
- Pipetas volumétricas de 5, 20,50 y 100 ml
- Probeta de 250 ml
- Embudo de vidrio
- Papel encerado
- Viales para HPLC
- Kit de clarificación de solventes para HPLC y kit de filtración de muestras para HPLC
- Jeringa de 50 o 100 μ L

7.2.4 INSTRUMENTOS Y EQUIPOS

- Balanza analítica con precisión de 0,1 mg
- Sistema HPLC con detector UV-VIS o arreglo de diodos a 280 nm
- Columna HPLC Waters Resolve C-18 de 5 micras, 3,9 x 300 mm o equivalente
- Baño ultrasónico
- Bomba de vacío
- Potenciómetro

7.2.5 SEGURIDAD

La trietilamina es flamable: Manejar lejos de fuentes de calor, usar solamente en espacios ventilados bajo campana de extracción. Evitar contacto con la piel y los ojos.

El ácido acético glacial puede causar severas quemaduras y es flamable, usar solamente en espacios ventilados con campana de extracción, usar guantes y gafas de seguridad.

El metanol es flamable y tóxico. No inhalar vapores y evitar contacto con la piel.

7.2.6 CONDICIONES HPLC

Detección:	UV-VIS o Arreglo de Diodos a 280 nm
Velocidad de flujo:	1,0 ml/min
Volumen de inyección:	50 µL
Tiempo de corrida:	20 min

7.2.7 DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD

7.2.7.1 PREPARACIÓN DE LA FASE MOVIL

- A un matraz volumétrico de 2000 ml adicionar 2.20 g de la sal de sodio del ácido 1-heptano sulfónico, 0,1 g de EDTA y 1 200 ml de agua grado HPLC.
- Adicionar 20 ml de trietilamina en la solución anterior.
- Adicionar 90 ml de ácido acético glacial para ajustar a un pH de 3,60 + 0,05 (Medidos con pipetas volumétricas; 50 y 20 ml)
- Adicionar 250 ml de metanol grado HPLC, y aforar con agua grado HPLC
- Filtrar la solución y degasificar.

7.2.7.2 PREPARACIÓN DEL ESTANDAR

- En un papel encerado, pesar analíticamente una cantidad de muestra homogénea de acuerdo a la siguiente formula:

$$\text{Peso del estándar en gramos} = \frac{\text{Nivel esperado de menadiona en g/Kg (1000)}}{(200)P}$$

Donde:

P es el % de Menadiona en el estándar
200 es el factor para peso de la muestra
1000 es el factor de conversión de mg a g

NOTA 1: No pesar menos de 0,04 g

- Transferir cuantitativamente a través de un embudo a un matraz volumétrico ámbar de 100 ml con fase móvil, aforar con la misma fase y sonificar por 10 min.
- Tomar 5 ml con pipeta volumétrica de la solución anterior y depositar en un matraz volumétrico de 250 ml color ámbar, aforar con la fase móvil.
- Filtrar la solución y depositar en un vial, inyectar 2 veces en el sistema HPLC.

7.2.7.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA (PREPARAR POR DUPLICADO)

- Pesar sobre un papel encerado 0,4 g de muestra con precisión 0,1 mg
- Transferir cuantitativamente a través de embudo a un matraz volumétrico ámbar de 100 ml con 100 ml de fase móvil, medidos con pipeta volumétrica.
- Sonificar en un baño ultrasónico a 40°C - 50°C por 15 min, agitar invirtiendo cada matraz y sonificar por 15 min más.
- Centrifugar la solución durante 2 min a 1 500 RPM o dejar reposar la muestra hasta que esté clara.
- Filtrar para HPLC la solución anterior y depositar en un vial.
- Inyectar dos veces en el sistema HPLC

7.2.7.4 CÁLCULOS

$$\text{Contenido de Menadiona en g/Kg} = \frac{A_a \times W_s \times P \times 1,000 \times 5}{A_s \quad W_a \quad 100 \quad 250}$$

Donde:

Aa	es el área del pico de la muestra
As	es el área del pico del estándar
Wa	es el peso de la muestra en gramos
Ws	es el peso del estándar en gramos
P	es el % de Menadiona en el estándar
1,000	es el resultado de convertir el factor de cálculo mg/Kg a g/Kg
5/250	son factores de dilución

8 MARCADO, ETIQUETADO ENVASE, EMPAQUE Y EMBALAJE

Debe cumplir con la NOM-ZOO-012-1993 (ver 2 Referencias). Es recomendable envasar la premezcla en empaque con barrera a la luz y a la humedad.

9 ALMACENAMIENTO

Almacenar en lugares frescos, secos y protegidos de la luz.

10 VIGENCIA

La presente norma mexicana entrará en vigor 60 días naturales después de la publicación de su declaratoria de vigencia en el **Diario Oficial de la Federación**.

11 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

**DR. FRANCISCO RAMOS GÓMEZ
DIRECTOR GENERAL DE NORMAS**

MRM/FLLL/JVG/KFS/LLE