

NMX-Y-339-SCFI-2008

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

**PRODUCTS FOR AGRICULTURAL USE -BALANCED
FEED INGREDIENTS FOR ANIMALS – VITAMIN E IN
PREMIX**

PREFACIO

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

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

- CÁMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA DE TRANSFORMACION.

- COMITÉ TÉCNICO DE NORMALIZACIÓN NACIONAL DE ALIMENTOS PARA ANIMALES

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

- NUTEK, 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 | 9 |
| 9 | Almacenamiento | 9 |
| 10 | Vigencia | 9 |
| 11 | Concordancia con Normas Internacionales | 9 |

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

**PRODUCTS FOR AGRICULTURAL USE -BALANCED
FEED INGREDIENTS FOR ANIMALS – VITAMIN E IN
PREMIX**

1 OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Esta norma mexicana establece las características y métodos de análisis de la Vitamina E 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 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. (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 E también llamada dl- α -tocoferol o tocoferil acetato, es la forma más común y poderosa de esta vitamina que requiere solo una cantidad pequeña de la grasa dietética para ser absorbida por el cuerpo. La Vitamina E es uno de los muchos alimentos nutritivos que tiene las propiedades protectoras y que actúa como defensa contra el daño del tejido causado por la oxidación, previene ciertos tipos de anemia protegiendo al glóbulo rojo, se cree también protector del glóbulo blanco que aumenta el sistema inmune y defiende al cuerpo contra enfermedades.

4 CLASIFICACIÓN

La vitamina E pertenece al grupo de las vitaminas liposolubles.

1 UI de Vitamina E = 1 mg de dl- α -tocoferol acetato

FORMA QUÍMICA

Vitamina E Acetato (dl- α -tocoferil acetato)

5 ESPECIFICACIONES

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

| Nombre | Concentración mínima |
|-----------------|----------------------|
| Vitamina E 50 | 50% |
| Vitamina E 50 S | 50% |

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 E EN PREMEZCLAS POR HPLC

7.1.1 PRINCIPIO

La premezcla se extrae en dimetilsulfóxido y metanol, después se determina el contenido de Vitamina E en un sistema HPLC fase inversa

7.1.2 REACTIVOS Y MATERIALES

- Matraces volumétricos ámbar de 100 ml
- Pipeta volumétrica de 10 ml
- Embudo de vidrio
- Loop de 50 microlitros
- Kit de clarificación de solventes para HPLC
- Kit de filtración de muestras para HPLC
- Viales
- Papel encerado
- Agua grado HPLC
- Metanol grado HPLC
- Metanol grado reactivo
- Dimetilsulfóxido (DMSO) grado reactivo
- Vitamina E Acetato estándar de referencia
- Jeringa de 100 ó 50 microlitros
- Pipetas Pasteur

7.1.3 INSTRUMENTOS Y EQUIPO

- Balanza analítica con precisión 0,1 mg
- Sistema HPLC con detector UV-VIS o arreglo de diodos
- Baño de ultrasonido
- Bomba de vacío

7.1.4 CONDICIONES HPLC:

Fase estacionaria: Waters Bondapak C-18 3,9 x 150 mm ó
equivalente (p.e. C-18 25 cm, 10 micras; ó
Pecospher C-18 3 x 3CR)

Fase móvil: Metanol/agua 90/10

Volumen de Inyección: 50 microlitros

Detección: UV-VIS 280 nm

Velocidad de flujo: 2,0 ml/min

Tiempo de corrida: arriba de 20 min.

7.1.5 DESCRIPCION DE LA ACTIVIDAD

Definición del peso de muestra

$$\text{peso de la muestra (g)} = \frac{5,7834}{V_E}$$

Donde:

5,7834 es el factor que resulta de dividir $\frac{12,750}{1\ 000/0,4536}$

12,750 es el factor constante de peso (viene del método original);

1 000 es el factor de conversión de Kg a g;

0,4536 es el factor de conversión de Lb a Kg, y

V_E es el valor esperado en g/Kg

NOTA 1: No usar más de 3 g de muestra. El método está validado para usar como máximo 3 g de muestra.

7.1.6 Preparación del estándar

- Pesar analíticamente el equivalente a 2 gotas (70 mg aproximadamente) de Vitamina E acetato estándar de referencia en un matraz volumétrico ámbar de 100 ml y diluir con Metanol.
- Tomar una Alícuota de 10 ml de esta solución.
- Aforar a 100 ml con Metanol.
- Disolver en ultrasonido.
- Aforar con metanol.
- Filtrar para HPLC y depositar en un vial.
- Inyectar 50 microlitros en el sistema HPLC de 2 a 3 veces.

7.1.7 Preparación de la muestra: (realizar por duplicado)

- Sobre un papel encerado, pesar con precisión de 0,1 mg la cantidad de muestra calculada en el inciso 7.1.5.
- Pasar cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 ml a través de un embudo de vidrio y arrastrar los residuos con una alícuota de 10 ml de DMSO.
- Agitar en ultrasonido durante 10 min.
- Adicionar una alícuota de 50 ml de Metanol grado reactivo en el matraz y dejar agitando durante 10 min más en el ultrasonido.
- Agitar la mezcla y filtrar para HPLC.
- Inyectar 2 veces en el sistema HPLC.

7.1.8 CÁLCULOS

$$\text{Vitamina E (g/Kg)} = \left(\frac{A}{Wt} \right) \frac{Wts}{As} \frac{60}{100} \left(\frac{P}{100} \right) (1000)$$

Donde:

| | |
|------|--|
| A | son las áreas del pico de Vitamina E en la muestra; |
| Wt | es el peso de la muestra en g; |
| Wts | es el peso del estándar de Vitamina E en g; |
| As | es el área del pico de vitamina E del estándar; |
| 60 | es la dilución de la muestra; |
| 100 | es la dilución del estándar; |
| P | es el contenido de vitamina E acetato en el estándar en %; |
| 100 | es el factor de conversión de % a mg, y |
| 1000 | es el factor de conversión de mg/Kg a g/Kg. |

NOTA 2: 1,0 mg de dl-alfatocoferil acetato= 1,0 UI de Vitamina E

7.2 DETERMINACIÓN DE VITAMINA E EN PREMEZCLAS POR HPLC

7.2.1 PRINCIPIO

Saponificación alcalina de la muestra; (liberación natural del ester de tocoferol para evaporación del éter y disolución del residuo en n-Hexano, inyección del extracto hexánico en una columna HPLC rellena de silica gel, detección espectrófotométrica del tocoferol.

7.2.2 INSTRUMENTOS Y EQUIPO

- Molino.
- Matraz redondo con fondo plano con condensador de reflujo.
- Baño de agua.
- Rotavapor.
- Módulos de HPLC:
 - Inyector automático
 - Bomba isocrática
 - Detector UV-VIS de longitud de onda variable
 - Integrador

7.2.3 REACTIVOS

Hasta donde sea posible todos los reactivos son grado reactivo

- Solución acuosa de hidróxido de potasio al 50%.
- Solución de ácido ascórbico al 0,5% (disolver 0,5g de ácido ascórbico en 4 ml de agua destilada mezclar y adicionar 20 ml de etanol , llevar a 100 ml con metanol).
- Éter dietílico, libre de peróxidos.
- Hexano.
- Dioxano.

7.2.4 CONDICIONES DE TRABAJO

Fase estacionaria: Silica gel Licrhosorb Si 60, 5 µm, MERCK
 Columna: Acero inoxidable, longitud 25,0 cm
 Velocidad de flujo: 1,0 ml/min
 Longitud de onda: 285 nm
 Volumen de inyección: 20 µL

7.2.5 PROCEDIMIENTO

7.2.5.1 SOLUCIÓN MUESTRA

| | UI VITAMINA E/Kg | PESO DE MUESTRA (g) |
|------------------------|------------------|---------------------|
| ALIMENTO | 1-500 | 10 |
| PREMEZCLAS | 500-1000 | 10 |
| VITAMINAS CONCENTRADAS | 1000 | 1-10 |

- Pesar con exactitud la muestra en un matraz redondo con fondo plano y adicione 70 ml Etanol y 15 ml de ácido ascórbico 0,5%.
- Mezclar hasta que el material se humedezca completamente. Enseguida lleve el contenido de los matraces a una temperatura de 70°C y saponifique durante 20 min bajo reflujo, agite de vez en cuando para prevenir que el material se adhiera a las paredes del matraz. Enfriar a temperatura ambiente.
- Transferir a un embudo de separación de manera cuantitativa, enjuague el matraz redondo con agua destilada, agregue aproximadamente 50 mL de éter etílico.

- Agitar vigorosamente 1 min y dejar separar los disolventes.
- Transferir la fase acuosa a un segundo embudo de separación agregando aproximadamente 50ml de éter etílico, agite por 1 min, deje que se separen las fases.
- Lavar las fases etéreas combinadas con agua destilada hasta neutralidad a la fenoftaleína.
Las fases etéreas se llevan a un matraz volumétrico de 250 ml, tome una alícuota del extracto etéreo (previamente calculado), evapore a sequedad en un rota vapor bajo vacío parcial con nitrógeno libre de oxígeno a una temperatura del baño de agua de aproximadamente 30°C, evapore las últimas trazas de agua por adición repetida de etanol.
- Disolver el residuo con hexano (ml previamente calculados), Solución de inyección.

7.2.5.2 SOLUCIÓN ESTÁNDAR

- Disolver 100 mg de dl-alfa-tocoferol en un matraz de 100ml, disolver con hexano, tomar 1 ml y llevarlo a 10 ml con hexano.
El contenido teórico aproximadamente es 10 µg/ml.

7.2.6 CÁLCULOS

Los cálculos de área o altura de los picos de vitamina E se suman juntos y se comparan con el pico del estándar de Vitamina E considerando el peso de la muestra y del extracto.

7.2.6.1 CONVERSIÓN

1 Unidad internacional (UI) de vitamina E correspondiente a 0,909 mg dl-alfa- tocoferol (1,0 mg dl-tocoferil acetato).

7.2.6.2 VARIACION DE RESULTADOS

| CONTENIDO VITAMINA E (mg/Kg) | RANGO ESTIMADO |
|---------------------------------|----------------|
| 1-10 | ± 20% |
| >10 | ± 10% |

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**