



SECRETARIA DE COMERCIO

Y

FOMENTO INDUSTRIAL

NORMA MEXICANA

NMX-F-234-1972

**“METODO DE PRUEBA PARA LA DETERMINACION DE
VITAMINA "A" EN LECHEs”**

*“TEST METHOD FOR DETERMINATION OF THE A VITAMIN IN
MILK”*

DIRECCION GENERAL DE NORMAS

“METODO DE PRUEBA PARA LA DETERMINACION DE VITAMINA "A" EN
LECHES”

“TEST METHOD FOR DETERMINATION OF THE A VITAMIN IN MILK”

1 ALCANCE

Esta Norma tiene por objeto establecer el método de prueba para la determinación de vitamina "A" en leches.

2 METODO ESPECTROFOTOMETRICO

.1 APARATOS Y EQUIPO

- Balanza granataria con sensibilidad de 0.1 g.
- Balanza analítica con sensibilidad de 0.0001 g.
- Espectrofotómetro con celdas apropiadas.
- Mortero de porcelana.
- Centrífugas hasta 3000 r.p.m.
- Aparato agitador mecánico.
- Estufa con regulador de temperatura.
- Matraz Erlenmeyer de 250 ml con tapón bihoradado.
- Matraces aforados de boca esmerilada de 25 ml y 50 ml.
- Vaso de precipitado de 250 ml.
- Matraz de boca esmerilada de 50 ml (ver 2.6.1.3).
- Tubos de centrifuga (1 cm de diámetro y 12 ml de volumen, de boca esmerilada).
- Pipetas de 2 y 5 ml (precisión normal) graduadas hasta la punta.
- Jeringas de tuberculina.
- Material común de laboratorio.

2.2 Materiales y Reactivos

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico, a menos que se indique otra cosa; y cuando se hable de agua, ésta debe ser destilada y recién hervida.

Vitamina "A" grado farmacéutico. Cuando se disponga de vitamina "A" con título conocido, éste se puede determinar por vía espectrofotométrica.

Solución de hidróxido potásico en alcohol. Se pesan 61.7 g de KOH y se colocan en un matraz volumétrico de 100 ml y se afora al volumen con agua. Se disuelve bien y de esta solución se toma un ml; se le agregan 10 ml de alcohol etílico, y se filtra.

Eter de Petróleo recién destilado y con punto de ebullición de 40-60 °C.

Cloroformo purísimo. Se emplea el disolvente deshidratado con sulfato sódico anhidro. Cerca de 500 ml de este disolvente más una pequeña cantidad de carbón activado se agitan en un frasco en el agitador mecánico durante 30 minutos; después se filtra y se destila; se introduce en la tubuladora del matraz recolector un tubo con cloruro de calcio, para evitar la penetración de humedad.

1-3 dicloro-2 propanol. (GDH) activado para la determinación de la vitamina A, destilándolo con tricloruro de antimonio bajo presión reducida de 40 mm de mercurio.

2.3 Toma de la Muestra

Se toma una muestra representativa del lote de prueba, de acuerdo con la norma de muestreo NMX-R-017 en vigor.

2.4 Procedimiento o Determinación

2.4.1 Saponificación

Se pesan con exactitud 10 g de la muestra, en un vaso, y se disuelven con 20 ml de agua a 40-50 °C; luego se traspasa cuantitativamente a un matraz volumétrico de 50 ml; se enfría a 20 °C y se afora a la marca con agua.

En caso de productos con más de 2500 U.I. por g, se pesan 5 g y se afora a 100 ml con agua y se mezcla completamente. Se toman con pipeta 2 ml de esta solución (agitando bien en el momento preciso de cada toma) en cada uno de 4 tubos de centrífuga.

Se agrega a cada tubo 2 ml de la solución alcoholica de KOH; se reemplaza el aire de los tubos por nitrógeno, se tapan y se agitan ligeramente.

Se saponifican durante 35 minutos, colocando los tubos en Baño María a 60 °C.

2.4.2 Extracción

2.4.2.1 Primera extracción.- Se colocan en cada tubo 2 ml de éter de petróleo y se agitan durante 10 minutos en el agitador mecánico, luego se centrifugan por 2 minutos.

A 200 r.p.m, se extrae la parte superior (éter de petróleo más vitamina A) con la jeringa de tuberculina y se recoge la porción de cada tubo en el matraz esmerilado de 50 ml, separadamente.

2.4.2.2 Segunda extracción.- Se colocan 2 ml de éter de petróleo en cada tubo y se agitan durante 10 minutos; se separa la parte superior y se agrega a la primera extracción, correspondiente a cada tubo.

2.4.2.3 Tercera Extracción.- Se coloca un ml de éter de petróleo en cada tubo y se agitan durante 5 minutos, luego se centrifuga por 2 minutos y se separa como se indicó anteriormente.

Por último se calienta el matraz en Baño María a $\pm 60^{\circ}\text{C}$, con el fin de eliminar el éter de petróleo de las extracciones continuadas de cada tubo, por evaporación bajo corriente de nitrógeno.

2.4.3 Reacción colorimétrica

Se disuelve el residuo agregándole 1 ml de cloroformo purísimo, y después 4 ml de 1-3 dicloro-2 propanol.

El matraz se coloca en el Baño María a 25°C , que es la temperatura necesaria para la reacción. Después de 2 minutos se hace la lectura de cada tubo, empleando para ello el espectrofotómetro.

1 celda rectangular de 1 cm de paso.

Longitud de onda de 550 milimicras.

Lectura en blanco con cloroformo purísimo.

2.4.4 Curva estandar de la vitamina A

A partir de la vitamina A estándar (1 g = 100,000 U.I), se hacen las siguientes diluciones:

- a) Se pesan exactamente 50 mg y se disuelven en cloroformo, luego se afora a 50 ml en el matraz (un ml = 100 U.I).
- b) Se diluyen con cloroformo puro 5 ml de la solución A en un matraz volumétrico (1 ml = 20 U.I).

Para establecer la curva se hacen las determinaciones indicadas en la siguiente Tabla I.

TABLA I

Contenido de U.I de vitamina A	2	4	8	12	16
ml Solución B	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8
ml de cloroformo	0.9	0.8	0.6	0.4	0.2
ml de Reactivo G.D.H.	4	4	4	4	4

2.5 CALCULOS Y RESULTADOS

La cantidad de vitamina A se calcula con las siguientes expresiones:

- 1) En caso de pesar 10 g de muestra se afora a 50 ml.

$$\text{U.I vitamina A}/100 \text{ g} = L \times 250.$$

2) En caso de pesar 5 g de muestra se afora a 100 ml.

U.I vitamina A/100 g= L x 1,000.

donde:

L = Lectura de U.I de vitamina A en la Tabla I.

2.6 APENDICE

2.6.1 Observaciones

2.6.1.1 Si la vitamina A grado farmaceutico no contiene 100,000 U.I/g, se debe pesar la cantidad necesaria o diluir de manera suficiente para obtener en la solución a) 100 U.I/ml.

2.6.1.2 Para la evaporación de disolventes, se puede emplear también un evaporador rotatorio que permita hacer un calentamiento uniforme del matraz en el Baño María, y la evaporación del disolvente al vacío.

2.6.1.3 Todo el material de vidrio usado en la determinación de vitamina debe ser de bajo grado actínico.

2.6.2 Bibliografía

Análisis de Vitaminas. Métodos comprobados Rolf Strobeck, Heinz M. Henning.

México, D.F., Abril 3, 1972

EL C. DIRECTOR GENERAL DE NORMAS.



ING. JOSE M. ALCALA A.

Fecha de aprobación y publicación: Abril 13, 1972