

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-119-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MATERIAS PRIMAS PARA ALIMENTOS, PRODUCTOS DE PERFUMERÍA Y BELLEZA. COLORANTES ORGÁNICOS NATURALES. ESPECIFICACIONES SANITARIAS.

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Salud.

JOSE MELJEM MOCTEZUMA, Director General de Control Sanitario de Bienes y Servicios, por acuerdo del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en los artículos 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 38, fracción II, 47 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 194 fracción I de la Ley General de Salud; 2o. fracción III, 659, 1238, 1243 y demás aplicables del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios; 8o. fracción IV y 13 fracción I del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud.

PREFACIO

En la elaboración de la presente norma participaron los siguientes Organismos e Instituciones:

SECRETARIA DE SALUD

Laboratorio Nacional de Salud Pública

Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios

SECRETARIA DE COMERCIO Y FOMENTO INDUSTRIAL

Dirección General de Políticas Comerciales

PROCURADURIA FEDERAL DEL CONSUMIDOR

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

ASOCIACION NACIONAL DE FABRICANTES DE PRODUCTOS AROMATICOS

CAMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA DE LA TRANSFORMACION

CAMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA DE PERFUMERIA Y COSMETICA

COCA COLA DE MEXICO, S.A. DE C.V.

CONFEDERACION DE CAMARAS INDUSTRIALES

INDUSTRIAS CUAMEX, S.A. DE C.V.

LABORATORIOS MIXIM, S.A.

MANE DE MEXICO, S.A DE C.V.

PROBAMEX, S.A DE C.V.

PRODUCTOS ROCHE, S.A DE C.V.

SPECTRUM, S.A DE C.V.

INDICE

0. INTRODUCCION
 1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION
 2. REFERENCIAS
 3. DEFINICIONES
 4. SIMBOLOS Y ABREVIATURAS
 5. CLASIFICACION
 6. ESPECIFICACIONES SANITARIAS
 7. MUESTREO
 8. METODOS DE PRUEBA
 9. ETIQUETADO
 10. ENVASE Y EMPAQUE
 11. CONTROL
 12. CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES
 13. BIBLIOGRAFIA
 14. OBSERVANCIA DE LA NORMA
 15. VIGENCIA
 16. APENDICE NORMATIVO
- Apéndice A

0. Introducción

Las disposiciones de la presente Norma Oficial Mexicana son de orden público e interés social y establece las especificaciones de identidad y pureza de los colorantes orgánicos naturales; para su aplicación en los alimentos y productos de perfumería y belleza, en los que se emplean como materias primas. Al considerarse éstos como aditivos, su uso puede representar un riesgo para la salud al encontrarse en ellos niveles altos de contaminantes, sustancias o solventes que se empleen para la extracción y que resultan perjudiciales para la salud del consumidor.

Dichas especificaciones sólo se satisfacen cuando en su elaboración se utilicen materias primas de calidad sanitaria, se apliquen buenas prácticas de fabricación, se realicen en locales e instalaciones bajo condiciones higiénicas, que aseguren que son aptos para uso y consumo humano, de acuerdo con lo establecido por la Ley General de Salud, su Reglamento y demás disposiciones aplicables de la Secretaría de Salud.

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1 Esta Norma Oficial Mexicana establece las especificaciones sanitarias que deben cumplir los colorantes orgánicos naturales.

1.2 Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el Territorio Nacional para las personas físicas o morales que se dedican a su proceso o importación.

2. Referencias

Esta norma se complementa con lo siguiente:

NOM-038-SSA1-1993	Colorantes orgánicos sintéticos. Especificaciones sanitarias generales.
NOM-116-SSA1-1994	Determinación de humedad en alimentos por tratamiento térmico. Método por arena o Gasa.*
NOM-117-SSA1-1994	Método de prueba para la determinación de cadmio, arsénico, plomo, estaño, cobre, hierro, zinc y mercurio en alimentos, agua potable y agua purificada por espectrometría de absorción atómica.*
NOM-118-SSA1-1994	Materias primas para alimentos, productos de perfumería y belleza. Colorantes inorgánicos. Especificaciones sanitarias.*

3. Definiciones

Para los fines de esta norma se entiende por:

3.1 Aditivos para alimentos, aquellas sustancias que se adicionan directamente a los alimentos y bebidas, durante su elaboración para proporcionar o intensificar aroma, color o sabor; para mejorar su estabilidad o para su conservación.

3.2 Buenas prácticas de fabricación, conjunto de normas y actividades relacionadas entre sí, destinadas a garantizar que los productos tengan y mantengan las especificaciones requeridas para su uso.

3.3 Colorante, material que imparte color a otro material o mezcla elaborado por un proceso de síntesis o similar; por extracción o por separación, obtenido de una fuente animal, vegetal o mineral y que posteriormente se ha sometido a pruebas fehacientes de seguridad que lo liberan para su uso en alimentos y en productos de perfumería y belleza o en alguna parte de ellos y que directamente o a través de su reacción con otras sustancias es capaz de impartir el color que le caracteriza.

3.4 Colorante orgánico natural, pigmento o sustancia que se obtiene a partir de materia vegetal o animal, con un limitado proceso químico o sin él y sometidos posteriormente a pruebas de identidad y pureza que les permita ser utilizados en alimentos, productos de perfumería y belleza, en alguna parte de éstos o en todo y que directamente o a través de su reacción con otras sustancias, es capaz de impartir el color que le caracteriza.

3.5 Envase, todo recipiente destinado a contener un producto y que entra en contacto con el mismo, conservando su integridad física, química y sanitaria.

3.6 Envase secundario, aquel que contiene al primario.

3.7 Etiqueta, todo rótulo, marbete, inscripción, imagen u otra forma descriptiva o gráfica ya sea que esté impreso, marcado, grabado, en relieve, hueco, estarcido o adherido al empaque o envase del producto.

3.8 Metal pesado o metaloide, aquellos elementos químicos que causan efectos indeseables en el metabolismo aun en concentraciones bajas. Su toxicidad depende de las dosis en que se ingieran, así como de su acumulación en el organismo.

3.9 Proceso, el conjunto de actividades relativas a la obtención, elaboración, fabricación, preparación, conservación, mezclado, acondicionamiento, envasado, manipulación, transporte, distribución, almacenamiento y expendio o suministro al público de productos.

4. Símbolos y abreviaturas

Cuando en esta norma se haga referencia a los siguientes símbolos y abreviaturas, se entiende por:

a alfa

b beta

cm centímetro

E coeficiente de extinción

CI Color Index

G gamma

g gramos

°C grados Celsius

kg kilogramo

KPa Kilo Pascal

l litro

µg microgramo

µl microlitro

mg miligramo

ml mililitro

mm milímetro

mmHg milímetros de mercurio

M molar

nm nanómetro

N normal

P peso

/ por

% por ciento

pH potencial de hidrógeno

x signo de multiplicación

Cuando en la presente norma se mencione al Reglamento, debe entenderse que se trata del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios.

5. Clasificación

5.1 Para efectos de esta norma los colorantes orgánicos naturales permitidos son:

5.1.1 En alimentos

Aceite de zanahoria (*Daucus carota*, L.);

Achiote, annato (extracto de semillas de *Bixa orellana*);

Azafrán (estigmas de *Crocus sativus*, L.);

Beta-Apo-8'-Carotenal;

Betabel Deshidratado;

Beta-caroteno;

Cantaxantina;

Color caramelo;

Clorofila;

Cochinilla (Extracto de *Coccus cacti*, L. o carmín);

Cúrcuma (polvo y oleorresina del rizoma de *Curcuma longa*, L.);

Extracto de color de uva (uva concord) (Antocianina);

Extracto de tegumento de uva (Enocianina);

Harina de semilla de algodón, cocida, tostada y parcialmente desgrasada;

Jugos de frutas;

Jugos de vegetales;

Pimentón en polvo (*Capsicum annum*, L.) Paprika;

Oleorresina de pimentón;

Riboflavina;

Riboflavina-5-fosfato;

Ester apocarotenoico, y

Xantófilas.

5.1.2 En productos de perfumería y belleza

Achiote, annato (Extracto de semillas de *Bixa orellana*);

Beta-caroteno;

Cochinilla (Extracto de *Coccus cacti*, L., o carmín);

Color caramelo;

Guaiazuleno;

Guanina, y

Henna

6. Especificaciones sanitarias

Los colorantes orgánicos naturales deben cumplir con las siguientes especificaciones físicas, químicas, de identidad y pureza:

6.1 Físicas y químicas

6.1.1 Aceite de zanahoria

Sinónimos: *Daucus carota*, L.

6.1.1.1 Pureza:

Hexano; no más de 25 mg/kg

Total de ácidos grasos; no menos de 85%

Valor de Iodo; de 118 a 134

Valor de saponificación; de 165 a 185

Materia insaponificable; no más de 14%

Alcohol isopropílico; no más de 100 mg/kg

6.1.2 Achiote, Annato

6.1.2.1 Físicas

Sinónimos: CI Natural Orange 4; Lebensmittel. Nr. 3 Rocou; Bixina; Norbixina; Orleans; Terre orellana

Clase: Carotenoide

Número de Código: CI (1956) 75120

CI (1954) 1241

Schultz (1931) 1387

Nombre Químico: La principal materia colorante de los extractos de bija o achiote en aceite es el carotenoide bixina. Es el éster dibásico simétrico. La materia colorante principal de los extractos acuosos de bija es la sal alcalina de la norbixina.

Peso Molecular: Bixina: 394,52

Norbixina: 380,48

Color: Amarillo (Naranja en solución)

Solubilidad: La bixina es insoluble en agua, ligeramente soluble en etanol y fácilmente soluble en éter y en los aceites.

Punto de Fusión: Bixina: 198°C

6.1.2.2 Pureza

Arsénico (como As); no más de 3 mg/kg

Plomo (como Pb); no más de 10 mg/kg

6.1.2.3 Identificación

6.1.2.3.1 Espectrofotometría de absorción, en cloroformo:

Bixina: Máximo a 503, 474,5 y 439 nm

E1%1cm 2870 a 502 nm

Norbixina: Máximo a 509, 471,5 y 442 nm

E1%1cm 2870 a 482 nm (en NaOH 0,1 N)

La bixina y la crocetina son los dos únicos carotenoides que no se oxidan fácilmente por el oxígeno del aire.

6.1.2.3.2 Cromatografía en columna:

Bija: La bixina es adsorbida enérgicamente en la superficie de la alúmina formando una zona rojo-naranja brillante (a diferencia de la crocetina). Con metanol o etanol producen un cambio de color; de naranja a amarillo-naranja.

Con la reacción de Carr-Price, la zona de la bixina se vuelve inmediatamente verde-azulado (diferencia de la crocetina).

Bixina: Tratamiento de bixina cristalizada con cloroformo y reacción de Carr-Price. Se obtiene color verde-azulado.

Soluciones alcalinas de norbixina

La norbixina forma una zona roja-naranja en la superficie de la columna.

6.1.3 Azafrán

Sinónimos: CI Natural yellow 6; Safran crocine; crocetina y croccus sativus.

6.1.3.1 Físicas

Número de código: CI 75100

Colorantes principales: crocina y crocetina

Peso molecular:

Crocina: 1 006,97

Crocetina: 328,41

Solubilidad:

Crocina: soluble en agua, ligeramente soluble en alcohol absoluto, glicerina y propilenglicol e insoluble en aceites vegetales.

Crocetina: muy poco soluble en agua y solventes orgánicos, soluble en piridina y bases orgánicas similares.

Punto de fusión:

Crocina: 186°C (con descomposición)

Crocetina: 285°C (con descomposición)

6.1.3.2 Pureza:

Cenizas; no más de 8 %

Colores extraños; negativo

Absorción máxima entre 464 y 434 nm

6.1.4 b-Apo-8'-carotenal

6.1.4.1 Físicas:

Sinónimos: CI Orange 6

Número de Código: CI 40820

Estado físico: sólido

Peso molecular: 416,65

Apariencia: polvo fino granular de color café pardo

Punto de fusión: 136-140°C (con descomposición)

Solubilidad: Insoluble en agua, ligeramente soluble en etanol y en aceites vegetales (hasta aproximadamente 1,5%)

6.1.4.2 Pureza:

Pérdida de peso por secado; no más de 0,2%

Residuos a la ignición; no más de 0,2%

Plomo (como Pb); no más de 10 mg/kg

Arsénico (como As); no más de 1 mg/kg

6.1.4.3 Identidad:

Espectrofotometría; no menos de 96 ni más de 101% de C₃₀H₄₀O

Absorción máxima en ciclohexano; 456 a 485 nm

6.1.5 Betanina

6.1.5.1 Físicas:

Sinónimos: Rouge de betteraves

Clase: Betanina.

Nombre Químico: Betanina 1-[2-(2,6 dicarboxi-1,2,3,4-tetra-hidroxi-4-piridilideno)- etilideno]-5- b-D-glucopiranosil-oxi-6-hidroxiindolium-2-carboxilato.

Peso molecular: 550,48

Descripción: Líquido, pasta o polvo color rojo o rojo pardo.

Color: Rojo

Solubilidad: Fácilmente soluble en agua, insoluble en alcohol absoluto.

6.1.5.2 Pureza:

Nitrato; no más de 2 g de anión nitrato/g de color rojo

Arsénico (como As); no más de 1 mg/kg

Plomo (como Pb); no más de 10 mg/kg

Mercurio (como Hg); no más de 1 mg/kg

Metales pesados; no más de 40 mg/kg

Material volátil; no más de 4%

Cenizas insolubles en ácidos; no más de 0,5%

Contenido de color rojo expresado como betanina; no menos de 0,4%

6.1.5.3 Identificación:

Espectrofotometría;

pH 5,4: máximo característico a 530 nm

pH 8,9: máximo impreciso a 535 nm

E1%1cm de la betanina pura a 535 nm en agua: 475-625

6.1.6 b-Caroteno

6.1.6.1 Físicas

Sinónimos: CI Natural Yellow 26; CI Natural Brown 5;

CI Food Orange 5; Natural b-Carotene; Mixed Carotenes

Clase: Caroteno

Números de Códigos: CI (1956) 75130

CI (1975) 75130

b-caroteno CI (1975) 40800

Schultz 1403

Peso molecular: 536,89

Color: Amarillo a naranja rojizo

Descripción: Cristales rojos en estado puro

Solubilidad: Los carotenos son insolubles en agua, ligeramente solubles en etanol y solubles hasta 1% en los aceites vegetales.

Punto de fusión: a-caroteno: 187°C

b-caroteno: 176-182°C

G-caroteno: 178°C

6.1.6.2 Pureza

Arsénico (como As); no más de 3 mg/kg

Plomo (como Pb); no más de 10 mg/kg

Pérdida de peso por secado; no más de 0,2%

Residuos a la ignición; no más de 0,2%

Ensayo espectrofotométrico: de 96 a 101%

6.1.6.3 Identificación

Espectrofotometría

E1%1cm de b-caroteno (trans) en hexano, máximo a 455-457nm y 482-486 nm.

Tratamiento con permanganato de potasio al 1% en álcali; se oxidan obteniendo sustancias incoloras.

Una solución de b-caroteno en acetona, después de un tratamiento con una solución al 5% de nitrito sódico y ácido sulfúrico 1 N; hay destrucción de carotenos y desaparición de color.

Cromatografía: Sólo se obtiene una zona para el b-caroteno puro.

6.1.7 Cantaxantina

6.1.7.1 Físicas

Sinónimos: CI Food orange 8; b-caroteno-4,4'-diona; Cantaxantina, y 4,4'-dioxo-b-caroteno.

Número de código: CI (1975) 40850

Peso molecular: 564,86

Estado físico: sólido

Descripción: Polvo cristalino de color violeta oscuro

Solubilidad: Es soluble en cloroformo, muy poco soluble en acetona e insoluble en agua, etanol y aceites vegetales.

Punto de fusión: 207-212°C

6.1.7.2 Pureza

Pérdida por secado; no más de 0,2%

Trans-cantaxantina y otros carotenoides totales; no más del 5%

Plomo; no más de 10 mg/kg

Arsénico; no más de 3 mg/kg

Mercurio; no más de 1 mg/kg

Cenizas sulfatadas; no más de 0,1%

Metales pesados; no más de 40 mg/kg

Residuos a la ignición; no más de 0,2%

Contenido; de 96-101% (expresado como cantaxantina)

6.1.7.3 Identificación

Ensayo espectrofotométrico:

Una solución de cantaxantina en ciclohexano tiene una absorbancia entre 468 y 472 nm.

6.1.8 Color caramelo

6.1.8.1 Físicas

Sinónimos: CI Natural brown 10

Estado físico; se presenta en forma líquida de color café oscuro o negro y en forma sólida con olor característico a azúcar quemada y sabor amargo.

Solubilidad; soluble en agua, ligeramente soluble en etanol, insoluble en éter, acetona y cloroformo.

6.1.8.2 Pureza

Plomo (como Pb); no más de 5 mg/kg

Arsénico (como As); no más de 3 mg/kg

Mercurio (como Hg); no más de 0,1 mg/kg

Nitrógeno amoniacal; no más de 0,5%

4-metil-imidazol; no más de 0,02%

Dióxido de azufre; no más de 0,1%

6.1.9 Clorofila

6.1.9.1 Físicas

Sinónimos: CI Natural Green 3; Lebensmittel-Grün Nr.1

Clase: Forbina (igual a dihidroporfina).

Números de Códigos: CI (1956) 75810

CI (1921) 1249a

Schultz (1931) 1403

Nombre Químico: Clorofila (a): Complejo magnésico de 1,3,5, 8- tetrametil-4- etil-2-vinil-9-ceto-10-carbometoxiforbinitil-7-propionato

Clorofila (b): Complejo magnésico de 1,5,8, trimetil-3-formil-4-etil-2-vinil-9- ceto-10-carbometoxiforbinitil-7-propionato

Peso molecular: Clorofila (a) 893,54

Clorofila (b) 907,52

Color: verde

Solubilidad: La clorofila es soluble en etanol, éter, cloroformo y bencina, insoluble en agua.

6.1.9.2 Pureza

Arsénico (como As); no más de 3 mg/kg

Plomo (como Pb); no más de 10 mg/kg

6.1.9.3 Identificación

Reacción en fase parda (tratamiento con hidróxido de potasio al 10% en metanol); se produce un color pardo, regresando rápidamente a su color original.

Reacción con etanol; se produce un color verde-azul con fluorescencia rojo intenso.

6.1.10 Cochinilla o carmín

6.1.10.1 Físicas

Sinónimos: CI Natural red 4: Lebensmittel- Rot. Nr. 2.

Cochenille; Acide carminique, Carmine.

Clase: Antraquinona.

Números de Códigos: CI (1956) 75470 CI (1924) 1239 Schultz (1931) 1381

Nombre Químico: Sales alcalinas y lacas alumínicas del ácido carmínico (el principio colorante)

Peso Molecular: Acido carmínico: 492,40

Color: Rojo

Solubilidad: Sus sales alcalinas son solubles en agua y disolventes etanólicos.

6.1.10.2 Pureza

Para el caso de la cochinilla

Arsénico (como As); no más de 1 mg/kg

Plomo (como Pb); no más de 10 mg/kg

pH; no menos de 5,0 y no más de 5,5 a 25°C

Proteína (N X 6,25); no más de 2,2%

Sólidos totales; no menos de 5,7 y no más de 6,3%

Alcohol metílico; no más de 150 mg/kg

Acido carmínico; no menos de 1,8%

Para el caso del Carmín

Arsénico (como As); no más de 1 mg/kg

Plomo (como Pb); no más de 10 mg/kg

Materia volátil (a 135°C por 3 horas); no más de 20%

Cenizas; no más de 12%

Acido carmínico; no menos del 50%

6.1.11 Cúrcuma

6.1.11.1 Físicas

Cúrcuma (Polvo y oleoresina del rizoma de *Curcuma longa*, L.)

Sinónimos: CI Natural Yellow 3; Lebensmittel - Gelb 6

Cúrcuma; Curcumine

Safran des Indes; Indian saffron

Clase: Di-cinamoil metano

Números de Códigos: CI (1956) 75300

CI (1924) 1238

Schultz (1931) 1374

Nombre Químico: Curcumina (el principal colorante);1,7-bis-(4-Hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-dieno

Otros colorantes:

Dimetoxi curcumina: 1-(4-hidroxifenil)-7-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dieno-3,5-diona

Bis-dimetoxi curcumina: 1,7-bis (4-hidroxifenil) hepta-1,6-dieno-3,5-diona

Peso molecular: Curcumina: 368,39

Dimetoxi curcumina: 338,39

Bis-dimetoxi curcumina: 308,39

Color: Amarillo

Solubilidad: La curcumina es soluble en etanol y en ácido acético glacial, insoluble en agua y en éter.

Punto de Fusión: Curcumina: 183°C

6.1.11.2 Pureza

Arsénico (como As); no más de 3 mg/kg

Plomo (como Pb); no más de 10 mg/kg

Metales pesados; no más de 40 mg/kg

Cenizas; no más de 10%

Humedad; no más de 6%

Contenido de curcuminoides expresados como curcumina; de 4% a 45%

Residuos de solventes:

Hidrocarburos clorados; no más de 3 mg/kg

Acetona; no más de 30 mg/kg

Isopropanol; no más de 3 mg/kg

Metanol; no más de 5 mg/kg

Hexano; no más de 2,5 mg/kg

6.1.11.3 Identificación

Reacción de extracto etanólico de cúrcuma con ácido sulfúrico concentrado; se produce un intenso color carmesí.

Ensayo del ácido bórico; se produce una coloración rojo-cereza.

6.1.12 Extracto de color de uva (uva concord) (antocianina)

6.1.12.1 Físicas

Sinónimos: Anthocyanes; Anthocyanins (antocianinas)

Clase: Sales de benzopirilo

Número de Código: Schultz (1931) 1394

Nombre Químico: Las antocianinas son glicósidos de sales de 2-fenilbenzopirilo, en su mayoría derivados de hidroxilados. Los aglucosones de las antocianinas se denominan antocianidinas.

Peso molecular:

Pelargonidina: 306,72

Cianidina: 322,72

Peonidina: 336,74

Delfinidina: 338,72

Petunidina: 352,74

Malvidina: 366,77

Color: Rojo, violeta o azul

Solubilidad: Todas las antocianidinas son solubles en agua.

pH: 5,0

6.1.12.2 Pureza

Arsénico (como As); no más de 1 mg/kg

Plomo (como Pb); no más de 10 mg/kg

6.1.13 Extracto de tegumento de uva (enocianina)

6.1.13.1 Pureza

Plomo (como Pb); no más de 10 mg/kg

Arsénico (como As); no más de 1 mg/kg

6.1.14 Harina de semilla de algodón cocida, tostada y parcialmente desgrasada.

6.1.14.1 Pureza

Arsénico (como As); no más de 0,2 mg/kg

Plomo (como Pb); no más de 10 mg/kg

Contenido de gopipol libre; no más de 450 mg/kg

6.1.15 Oleorresina de paprika

6.1.15.1 Físicas

Sinónimo: Extracto de paprika

Clase: Carotenoide

Solubilidad: Muy soluble en aceites vegetales; poco soluble en agua, insoluble en glicerina.

Nombre químico:

Capsaicina: N [(4-hidroxi-3-metoxifenil)metil] -8-metil-6-nonanamida; trans-8-metil- N-vainillil-6-nona-nanamida; N-(4-hidroxi-3-metoxibencil)-8-metil-non-trans-6-enamida.

Colorantes principales:

Capsantina: 3,3'-b-dihidroxi, kapa-caroteno-6'-ona, (3S,3'S, 5R,5'R)

Capsorubina: Kappa, kappa-caroteno-6,6'-diona,3,3'dihidroxi,(3S, 3S', 5R, 5'R)

Peso molecular:

Capsaicina: 305,40.

Capsantina: 584,85.

Capsorubina: 600,85.

Descripción: Líquido viscoso de color rojo violáceo oscuro

6.1.15.2 Pureza

Capsaicina; no más de 0,5%

Arsénico; no más de 3 mg/kg

Plomo; no más de 10 mg/kg

Metales pesados; no más de 40 mg/kg

Residuos de solventes:

Acetona; no más de 30 mg/kg

Isopropanol; no más de 30 mg/kg

Metanol; no más de 50 mg/kg

Etanol; no más de 50 mg/kg

Hexano; no más de 25 mg/kg

6.1.15.3 Identidad:

Espectrofotometría: máxima absorción a 470 nm en hexano.

6.1.16 Riboflavina

6.1.16.1 Físicas

Sinónimos: Lactoflavín; Lactoflavina; Vitamina B2

Clase: Iso - aloxacina

Nombre Químico: 7,8-dimetil-10-(1,-D- ribitol)-iso-aloxacina

Peso molecular: 376,37

Color: Amarillo

Solubilidad: Escasamente soluble en agua, insoluble en etanol, éter, cloroformo y acetona

Punto de fusión: 280°C aproximadamente

6.1.16.2 Pureza

Arsénico (como As); no más de 3 mg/kg

Plomo (como Pb); no más de 10 mg/kg

Pérdida por desecación; no más de 1,5%

Residuos a la ignición; no más de 0,3%

Contenido de C₁₇H₂₀N₄O₆ calculado en base seca; no menos de 98% y no más de 102%.

Material colorante subsidiario, lumiflavina. Pasa la prueba.

6.1.16.3 Identificación

Rotación específica: [α]_{20D} de -120 a -135°

Espectrofotometría: Máximos de Riboflavina 220 a 225, 266, 374 y 444 nm.

Reacción con ditionito sódico: desaparición de una intensa fluorescencia verde-amarillenta.

Rotación específica: [α]_{25D} = -112 a -122° (50 mg en 2 ml de solución alcohólica de NaOH 0,01 N diluida con H₂O a 10 ml).

Determinación de Lumiflavina en presencia de cloroformo exento de etanol.

6.1.17 Riboflavina-5-fosfato

6.1.17.1 Físicas

Clase: Aloxacina

Descripción: Polvo cristalino de color amarillo-naranja

Nombre químico: Sal monosódica del 5-monofosfato éster de riboflavina

Solubilidad: Soluble en agua, insoluble en etanol

Peso molecular: 547,37

6.1.17.2 Pureza

Fosfato libre; no más de 1%, calculado como PO₄

Riboflavina libre; no más de 6%

Pérdida al secado; no más de 7 %

pH en solución 1:100; entre 5-6,5

Residuos a la ignición; no más de 25%

Difosfato de riboflavina; no más de 6%, calculado como riboflavina

Contenido no menos del equivalente de 75% de riboflavina

Lumiflavina, pasa la prueba (C₁₇H₂₀N₄O₆)

Aminas primarias aromáticas; no más de 70 mg/kg calculado como anilina

6.1.17.3 Identificación

Rotación específica [α]_{25°D} entre +37,0 y +42,0 calculado en base seca.

6.1.18 Ester apocarotenoico

6.1.18.1 Físicas

Solubilidad: Poco soluble en aceites y grasas

Apariencia: Aceite viscoso de color café-rojizo

6.1.18.2 Pureza

Valor de peróxido; máximo 10%

Plomo; no más de 10 mg/kg

Contenido de éster apocarotenoico; mínimo 20%

6.1.18.3 Identificación

Absorción máxima 447-449 nm

6.1.19 Xantófilas

6.1.19.1 Físicas

Sinónimos: Cantaxantina; flavoxantina; criptoxantina; luteína, filoxantinas; rubixantinas; rodoxantina; violaxantina; zeaxantina.

Clase: Carotenoide

Números de Códigos: CI (1924) 1249a

Schultz (1931) 1403

Nombre Químico: Derivados cetónicos o hidroxílicos de los carotenos.

Peso Molecular: Luteína; 568,85

Estado físico: sólido

Color: Amarillo

Solubilidad: Las xantófilas son solubles en grasas y disolventes grasos y casi insolubles en éter de petróleo.

Punto de fusión: Flavoxantina: 184°C Luteína: 190°C

Rubixantina: 160°C Violaxantina: 207°C

Rodoxantina: 219°C Zeaxantina: 215,5°C

6.1.19.2 Pureza

Arsénico (como As); no más de 3 mg/kg

Plomo (como Pb); no más de 10 mg/kg

Mercurio (como Hg); no más de 1 mg/kg

Pérdida por desecación; no más de 0,2%

Residuos a la ignición; no más de 0,2%

Total de carotenoides, otros diferentes de trans-cantaxantina, no más de 5%

6.1.19.3 Identificación

Espectrofotometría no menos de 96 ni más de 101% (luteína)

6.1.20 Guaiazuleno

6.1.20.1 Físicas

Nombre químico: 1,4-dimetil-7-isopropil-azuleno

Punto de fusión: 30,5-31,5°C

6.1.20.2 Pureza

Plomo (como Pb); no más de 20 mg/kg

Arsénico (como As); no más de 3mg/kg

Mercurio (como Hg); no más de 1 mg/kg

Color total; no menos de 99%

6.1.21 Guanina

6.1.21.1 Físicas

Sinónimos: CI Natural White 1

Número de Código: CI 75170

Descripción: material cristalino

Peso molecular: Guanina 151,13

Hipoxantina 136,11

6.1.21.2 Pureza

Residuos a la ignición; no más de 2 %

Plomo; no más de 20 mg/kg

Arsénico; no más de 3 mg/kg

Mercurio (como Hg); no más de 1 mg/kg

Contenido total de purinas; no menos de 96%

Guanina; no menos de 75%

Hipoxantina; no más de 25%

6.1.22 Henna

6.1.22.1 Físicas

Sinónimos: CI Natural Orange No. 6

Número de Código: CI 75480

Color: Naranja a rojo

6.1.22.2 Pureza

Humedad; no más de 10%

Cenizas totales; no más de 15%

Cenizas ácidas insolubles; no más de 5%

Plomo (como Pb); no más de 20 mg/kg

Arsénico (como As); no más de 3 mg/kg

6.2 Microbiológicas

Los colorantes objeto de esta norma deben estar exentos de microorganismos patógenos.

7. Muestreo

El procedimiento de muestreo para los productos objeto de esta norma deben sujetarse a lo que establece la Ley General de Salud.

8. Métodos de prueba

Para la verificación de las especificaciones químicas que se establecen en esta norma, se deben aplicar los métodos de prueba señalados en el Apartado de referencias.

Para las determinaciones específicas se deben aplicar los Métodos de prueba señalados en el Apéndice normativo A.

9. Etiquetado

La etiqueta de los productos objeto de esta norma, además de cumplir con lo establecido en el Reglamento y la Norma Oficial Mexicana correspondiente, debe sujetarse a lo siguiente:

Color Index (en su caso);

Nombre químico;

Declaración de pureza;

10. Envase y empaque

10.1 Envase

Los productos objeto de esta norma se deben envasar en recipientes de tipo sanitario, elaborados con materiales inocuos y resistentes a distintas etapas del proceso, de tal manera que no reaccionen con el producto o alteren las características físicas, químicas y organolépticas.

10.2 Empaque

Se deben usar envolturas de material resistente y que ofrezcan la protección adecuada a los envases para impedir su deterioro exterior, a la vez que faciliten su manipulación, almacenamiento y distribución.

11. Control

Cada lote de producción debe estar respaldado por un certificado de análisis del productor y hoja de identidad con las especificaciones establecidas en esta norma. Esta información estará a disposición del consumidor que la solicite.

12. Concordancia con normas internacionales

Esta norma no tiene concordancia con normas internacionales.

13. Bibliografía

13.1 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1992. Ley Federal sobre Metrología y Normalización. México, D.F.

13.2 Secretaría de Salud. 1991. Ley General de Salud. México, D.F.

13.3 Secretaría de Salud. 1988. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios. México, D.F.

13.4 The Office of Federal Register National Archives and Record Administration. 1990. Code of Federal Regulations 21. USA.

13.5 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1993. NORMA-008-SCFI-1993 Sistema General de Unidades de Medida. México, D.F.

13.6 Association of Analytical Chemists. 1990. Official Methods of Analysis. Vol. 1, 15th. Edition. USA.

13.7 Committee on CODEX Specifications. 1981. Food Chemicals Specifications. 3rd. Edition. National Academic Press. Washington, USA.

13.8 Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association Inc. 1983. CTFA Compendium of Cosmetic Ingredient Composition. 5th. Edition. CTFA. Washington, USA.

13.9 Food and Agriculture Organization of the United Nations. 1988. FAO Food and Nutrition Paper. No. 5 Rev 2. Guide to specifications. Rome, Italy.

13.10 Food and Agriculture Organization of the United Nations. 1988. FAO Food and Nutrition Paper. No. 38 Specifications for identity and purity of certain food additives. Rome, Italy.

13.11 Food and Agriculture Organization of the United Nations. 1990. FAO Food and Nutrition Paper. No. 49 Specifications for identity and purity of certain food additives. Rome, Italy.

13.12 Marmion D.M. 1991. Handbook of U.S. Colorants Foods, Drugs, Cosmetics and Medical Devices. Third Edition. John Wiley and Sons. New York, USA.

13.13 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1981. NORMA-Z-013/02. Guía para la Redacción, Estructuración y Presentación de las Normas Oficiales Mexicanas. México, D.F.

14. Observancia de la norma

La vigilancia en el cumplimiento de la presente norma corresponde a la Secretaría de Salud.

15. Vigencia

La presente Norma Oficial Mexicana entrará en vigor con su carácter de obligatoria a los treinta días siguientes a partir de su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 10 de mayo de 1995.- El Director General, José Meljem Moctezuma.- Rúbrica.

Apéndice Normativo A

A. METODOS DE PRUEBA

Todos los reactivos empleados en estas pruebas deben ser grado analítico, a no ser que se indique otra cosa. Cuando se hable de agua debe entenderse agua destilada.

1. Aceite de zanahoria

1.1 Determinación del índice de yodo

Método del yodo-cloruro

1.1.1 Procedimiento

Colocar la muestra en un matraz de yodo, seco y agregar 20 ml de tetracloruro de carbono y disolver. Agregar 25 ml de solución de yodo-cloruro, tapar el matraz con el tapón previamente humedecido con solución reactivo de yoduro de potasio, dejar reposar en un lugar oscuro a temperatura de $25 \pm 5^\circ\text{C}$ durante 30 minutos con agitación ocasional. Agregar en el orden mencionado 20 ml de solución reactivo de yoduro de potasio sobre el cono del matraz, cuidadosamente quitar el tapón y enjuagarlo junto con las paredes del matraz con 100 ml de agua recientemente hervida, agitar y titular con solución 0,1 M de tiosulfato de sodio, usando casi al final de la titulación solución indicadora de almidón. Anotar los ml consumidos (a). Simultáneamente realizar un blanco de manera similar y anotar los ml consumidos como (b). La diferencia entre los volúmenes en ml de solución 0,1 M de tiosulfato de sodio consumidos por el blanco y la muestra, multiplicada por 1,269 y dividida entre el peso de la muestra tomada en g es el valor del yodo. El peso aproximado en g que debe usarse para el análisis se puede calcular dividiendo el límite superior del valor del yodo esperado entre 20. Si se consume más de la mitad del halógeno disponible repetir la prueba usando menor cantidad de muestra.

1.2 Determinación del índice de saponificación

1.2.1 Procedimiento

Colocar en un matraz con tapón esmerilado de 250 ml de 1,5 a 2 g de la muestra exactamente pesados, agregar 25 ml de la solución 0,5 N de hidróxido de potasio en etanol. Ensamblar al matraz un condensador adecuado, calentar en un baño de vapor, mantener a reflujó durante 30 minutos agitando por rotación el contenido del matraz. Agregar 1 ml de solución indicadora de fenoltaleína y valorar el exceso de hidróxido de potasio con solución 0,5 N de ácido clorhídrico (HCl).

Correr simultáneamente una prueba en blanco de reactivos usando las mismas cantidades y valorando de la misma manera.

Calcular el índice de saponificación por medio de la fórmula siguiente:

$$S = 28,05 \times (B - V)/m$$

donde:

S = Índice de saponificación de la muestra.

B = Mililitros de la solución 0,5 N de ácido clorhídrico gastados en la valoración del blanco.

V = Mililitros de la solución 0,5 N de ácido clorhídrico gastados en la valoración de la muestra.

28,05 = miliequivalentes de la solución 0,5 N de hidróxido de potasio.

m = Peso en gramos de la muestra.

1.3 Determinación del índice de peróxidos

1.3.1 Procedimiento

Pesar con exactitud una cantidad aproximada a 5,0 g de la muestra, transferirlos a un matraz yodométrico de 250 ml, adicionar 30 ml de una mezcla de 3 volúmenes de ácido acético glacial y 2 volúmenes de cloroformo, agitar hasta disolución y adicionar 0,5 ml de solución saturada de yoduro de potasio. Tapar el matraz y dejar reposar la mezcla por 1 minuto exactamente, agitar de vez en cuando; adicionar 30 ml de agua y titular gradualmente con solución 0,01 M de tiosulfato de sodio con agitación vigorosa y continuar hasta que casi desaparezca el color amarillo, adicionar 0,5 ml de solución indicadora de almidón y continuar la titulación agitando vigorosamente hasta que desaparezca el color azul.

Calcular el blanco de reactivos.

Calcular el índice de peróxidos por medio de la fórmula siguiente:

$$\text{Índice de peróxido} = 1000 M \times (a-b)/m$$

donde:

a = ml de solución de tiosulfato de sodio gastados en la titulación de la muestra.

b = ml de solución de tiosulfato de sodio gastados en la titulación del blanco.

M = molaridad de la solución de tiosulfato de sodio.

m = peso en g de la muestra.

2. Achiote, annato

2.1 Determinación de Annato Soluble en Aceite:

2.1.1 Procedimiento

2.1.1.1 Método A. Disolver 0,1 g de la muestra en cloroformo y diluir con cloroformo en un matraz volumétrico a 100 ml. Determinar el espectro de absorción de la muestra, usando una celda de 1 cm entre 600 nm y 400 nm. Medir la absorbancia en el máximo de absorción cerca de 503 nm y a 404 nm y correr un blanco con solvente.

$$[A_{503} + A_{404} - 0,256 (A_{503})] \times 100$$

$$\% \text{ de color puro (como bixina)} = \text{-----}$$

$$(c) \quad 286,6 \times 1 \times a$$

donde:

A = Absorbancia de la solución problema a la longitud de onda indicada.

l = Longitud de la celda patrón (en cm).

a = Concentración de la muestra (en g/l).

0,256 = Factor relacionado con la absorbancia de bixina en cloroformo a 404 nm y 503 nm.

282,6 = Absortibilidad de bixina a 503 nm (en l/g-cm).

2.1.1.2 Método B. Determinar la absorbancia corriendo un blanco de una solución de cloroformo y muestra al máximo a 467 nm. Calcular el por ciento de color como bixina usando 320 l/g-cm como la absortibilidad.

2.2 Determinación de Annato Soluble en agua:

2.2.1 Procedimiento

Disolver 2 g de muestra en solución acuosa de hidróxido de potasio al 5% y medir el máximo de absorbancia a 480 nm.

Calcular el por ciento de pureza de color como bixina usando 287 l/g-cm como la absorptividad.

2.3 Determinación de Annato, Emulsiones:

2.3.1 Procedimiento

Disolver la muestra en cloroformo 1:1 v/v. Ajustar acidificando con unas gotas de ácido acético glacial, y medir nuevamente la absorbancia del mismo solvente a la máxima absorción 500 nm.

Calcular el por ciento de pureza de color, usando 287 l/g-cm como la absorptividad.

3. Azafrán

3.1 Determinación de cenizas

En una cápsula previamente tarada, se pesan exactamente 5 g de azafrán y se introduce en una estufa de desecación a temperatura de 100-105°C, manteniéndola hasta peso constante. El residuo se somete a calcinación a temperatura no superior al rojo sombra (alrededor de 525°C). El exceso de peso sobre la tara del crisol o cápsula, multiplicado por 20 da el porcentaje de cenizas.

3.2 Determinación de colorantes extraños

Tratar una pequeña cantidad de azafrán con bencina. No debe ceder color alguno; en caso de hacerlo puede sospecharse la presencia de ácido pícrico o derivados del alquitrán. Hervir una pequeña cantidad de azafrán con cianuro potásico y potasa, la aparición de color rojo púrpura revela la presencia de ácido pícrico.

4. b-apo-8'-carotenal

4.1 Identificación

Determinar la absorbancia de la solución B preparada directamente a 488 y 460 nm. El radio A_{488}/A_{460} está entre 0,77 y 0,85.

Determinar la absorbancia de la solución B a 460 nm y de la solución A a 332 nm. El radio $A_{332}/(10 \times A_{460})$ está entre 0,063 y 0,075.

Solución A. Transferir 40 mg de la muestra, exactamente pesada, dentro de un matraz volumétrico de 100 ml, disolver en 10 ml de cloroformo libre de ácido, llevar al volumen con ciclohexano y mezclar. Tomar 2 ml de esta solución con pipeta y colocarla en un matraz volumétrico de 50 ml, llevar al volumen con ciclohexano y mezclar.

Solución B. Tomar con una pipeta 5 ml de la solución A y colocarla en un matraz volumétrico de 50 ml, llevar al volumen con ciclohexano.

4.2 Procedimiento

Determinar la absorbancia de la solución B en una celda de 1 cm en un máximo de absorción de longitud de onda de 460 nm con espectrofotómetro, usando ciclohexano como blanco.

Calcular la cantidad en mg de C₃₀H₄₀O en la muestra mediante la siguiente fórmula:

$$\text{mg de C}_{30}\text{H}_{40}\text{O} = 25000 A/264$$

en el cual A es la absorbancia de la solución y 264 es la absorptividad de b-apo-8'-carotenal puro.

5. Betanina

5.1 Determinación de por ciento de color en Betanina

5.1.1 Reactivos:

Solución Buffer (pH 5)

5.1.2 Procedimiento

Disolver una cantidad pesada correctamente en una solución buffer y diluir a un volumen conveniente con la solución buffer (V total en ml); la absorción máxima puede ser en el rango de 0,2 a 0,8. Centrifugar la solución si es necesario, y medir la absorción corrigiendo con un blanco compuesto de solución buffer (pH 5).

El contenido de color está calculado en las bases de la máxima absorción A (a 530 nm) usando la absorbancia específica para betanina.

$$A1\% = 1120$$

1cm

A x V

% color rojo (C) =-----

1120 x L x W

donde:

A = absorbancia máxima.

V = volumen de solución probada medida en ml.

L = longitud de la celda medida en cm.

W = peso de muestra en g.

5.2 Determinación de Nitratos en Betanina

5.2.1 Reactivos

Solución estándar de nitrato - (10,000 mg/l)

Disolver 16,31 g de nitrato de potasio (KNO₃), previamente secado a 105°C por 24 horas en 1 000 ml de agua.

Solución buffer. Disolver 6,66 g de sulfato de aluminio octahidratado, Al₂(SO₄)₃ .8H₂O, 3,12 g de sulfato de plata (Ag₂SO₄), 1,24 g de ácido bórico (H₃BO₃) en 900 ml de agua, ajustar a pH 3,0 con ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1 M y diluir con agua a 1 000 ml.

Solución buffer diluida. Diluir la solución estándar con la solución buffer diluída, preparar en orden las siguientes soluciones: 0, 100, 200, 300, 400, 500 mg nitrato/l.

5.2.2 Procedimiento

Pesar exactamente 0,5 g de la muestra en un matraz Erlenmeyer, adicionar 50 ml de solución buffer diluida y disolver con agitación.

Medir el potencial de la solución calibrada y también de la solución problema.

Trazar la curva de calibración usando papel antilogarítmico, marcando en las abcisas la concentración de nitrato. De la curva de calibración, leer la concentración de nitrato de la muestra.

Cálculos:

a

Contenido de Nitrato =-----g / g demateria colorante

200 x W x C

donde:

a = Concentración de nitrato de la muestra, mg/l.

W = Peso de la muestra.

C = % color rojo calculado.

6. b-caroteno

6.1 Determinación de b-caroteno (Soluble en agua fría)

6.1.1 Procedimiento

Pesar exactamente 120 mg de la mezcla en un matraz volumétrico de 250 ml. Adicionar 5 ml de agua destilada y tratar con ultrasonido a máximo de 60°C por aproximadamente 10 minutos. Enfriar la solución bajo una corriente de agua fría, adicionar 100 ml de etanol absoluto, mezclar y llevar a volumen con dietil éter. Centrifugar 50 ml de esta solución turbia por 5 minutos. Tomar una alícuota de 5 ml de la solución clara y colocar en un matraz volumétrico de 100 ml, evaporar a sequedad en un rotavapor a 50°C.

Después de enfriar, lavar el residuo con 1 ml de etanol absoluto y diluir a 100 ml con ciclohexano (solución a medir). Con un espectrofotómetro con banda de amplitud de aproximadamente 1 nm, medir la absorbancia de la solución final a 454 nm contra ciclohexano, usando celdas de cuarzo de 1 cm.

A₄₅₄ x 5000

Contenido deb - caroteno % = -----

2230 x W

donde:

A₄₅₄ = Absorbancia de la solución final a 454 nm.

W = Peso de la muestra.

2230 = Absorbancia de referencia (1%, 1 cm).

5000 = Factor de dilución.

6.2 Determinación de b-caroteno en emulsión

6.2.1 Procedimiento

Pesar exactamente 100 mg de la muestra en un matraz volumétrico de 100 ml. Adicionar 25 ml de agua destilada y tratar con ultrasonido por 5 minutos a 20°C. Adicionar 2 ml de HCl 1 N, 5 ml de etanol y 50 ml de cloroformo. Agitar por 20 minutos y centrifugar por 10 minutos. Decantar la solución sobrenadante, tomar 5 ml de ésta y transferirla a un matraz volumétrico de 50 ml y llevar al volumen con ciclohexano. Con espectrofotómetro adecuado medir la absorción de la solución final a 454 nm, usando ciclohexano como blanco.

Calcular el contenido en base a E 1%1cm = 2230, el cual es el valor teórico correspondiente al radio de isomería presente en el producto.

7. Cantaxantina

7.1 Determinación de cenizas sulfatadas

7.1.1 Procedimiento

Transferir 2 g de muestra a un crisol previamente tarado de platino u otro contenedor de material apropiado de 50 o 100 ml y añadir suficiente H₂SO₄ diluído para humedecer totalmente la muestra. Calentar suavemente usando una parrilla o un mechero, o una lámpara infrarroja, hasta que la muestra esté perfectamente seca, continuar calentando hasta que toda la muestra haya sido carbonizada y enfriar. Humedecer el residuo con 0,5 ml de ácido H₂SO₄ concentrado y calentar de la misma manera hasta que los restos de la muestra y el exceso de H₂SO₄ hayan sido volatilizados.

Finalmente incinerar en una mufla calentando a 800 ± 25 °C por 15 minutos o más si es necesario, hasta completar la ignición, enfriar en un desecador y pesar.

(Nota: En el periodo en que se promueve la volatilización de H₂SO₄, se aconseja añadir algunos fragmentos de carbonato de amonio justamente antes de completar la ignición).

8. Color caramelo

8.1 Determinación de Nitrógeno Amoniacal

8.1.1 Materiales y reactivos

2 mantillas de calentamiento

2 matraces balón de 300 ml con junta 24/40

2 destiladores Kjeldahl

Perlas de ebullición

2 vasos de precipitados de 230 ml

Hidróxido de sodio 0,5 N

Acido clorhídrico 0,05 N

Oxido de magnesio

Indicador rojo de metilo

Antiespumante

8.1.2 Procedimiento

Pesar cuidadosamente 3,0 g de muestra y transferirla al matraz balón con 200 ml de agua destilada. Adicionar 2 g de óxido de magnesio, 2-3 gotas de antiespumante y perlas de ebullición.

Preparar el blanco de reactivos, colocar 200 ml de agua destilada, 2 g de óxido de magnesio, 2-3 gotas de antiespumante y perlas de ebullición. En 2 vasos de precipitados, colocar en cada uno 25 ml de HCl 0,05 N con 2 gotas de indicador rojo de metilo, siendo éstos los vasos receptores. Conectar el matraz balón con el refrigerante y asegurarse que la descarga del refrigerante esté por debajo del nivel de ácido en el vaso receptor. Trabajar simultáneamente la muestra y el blanco de reactivos. Someter a calentamiento hasta que por destilación se hayan colectado aproximadamente 100 ml de líquido.

Titular el contenido del vaso receptor a pH 6,2 con NaOH 0,05 N. Calcular el porcentaje de nitrógeno amoniacal.

$$(\text{ml HCl} \times \text{N HCl}) - (\text{ml Na OH} \times \text{N NaOH}) \times 1,4007$$

$$\% \text{ de Nitrógeno amoniacal} = \text{-----}$$

Peso de la muestra

8.2 Determinación de 4-metilimidazol

8.2.1 Materiales y reactivos

Cromatógrafo de gases, equipado con detector de hidrógeno con ionización de flama, columna de vidrio silanizada empacada con 7,5% de carbowax 20 M + 2% de KOH sobre una malla 90/100.

Tubo de vidrio para cromatografía 22 x 300 mm con llave de teflón removible

Matraces volumétricos de 5, 10 y 50 ml

Embudo de plástico 100 mm de diámetro

Matraz balón de 300 ml

Vaso de precipitados de plástico

Aparato de destilación

Pipetas Pasteur

Fibra de vidrio Pyrex

Evaporador rotatorio al vacío

Diclorometano

2-metilimidazol

4-metilimidazol

Tetrahidrofurano o acetona

Hidróxido de sodio 3,0 N (disolver 120 g en 1 l de agua destilada)

Celite 545 o equivalente

8.2.2 Procedimiento

8.2.2.1 Purificación de reactivos

Técnica de estándar externo. Purificar los cristales del 4-metilimidazol grado reactivo sometido a destilación al vacío (punto de ebullición 92-93°C y 0,05 mm Hg).

8.2.2.2 Preparación de soluciones estándar

Pesar cuidadosamente 50 mg del reactivo antes purificado colocar en un matraz aforado de 50 ml y disolver con tetrahidrofurano o acetona hasta obtener el volumen.

Tomar de cada matraz alícuotas de 0,25, 0,50, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0, 3,5, 4,0 y 5,0 ml y colocarlas en matraces aforados de 10 ml cada una, adicionar tetrahidrofurano o acetona hasta obtener el volumen. Las soluciones estándares preparadas representan concentraciones de 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 y 500 mg/kg de 4-metilimidazol. Refrigerar las soluciones.

8.2.2.3 Preparación de la muestra

Pesar 10,0 g de color y 5,0 g de hidróxido de sodio (NaOH) 3 N, colocarlos en el vaso de plástico, mezclar perfectamente. El pH de la mezcla no debe ser mayor a 12.

Adicionar 20,0 g de celite 545 o equivalente y mezclar con una espátula de acero inoxidable hasta que esté homogénea es decir que el color sea uniforme. La mezcla queda semiseca. Taponar con fibra de vidrio Pyrex la parte interior del tubo para cromatografía de 22 x 300 mm, transferir totalmente la mezcla anterior con ayuda del embudo de plástico y taponar con fibra de vidrio la parte superior del tubo. Acomodar el contenido, dejando caer verticalmente el tubo hasta que queden 10 cm de distancia entre el tope y la superficie empacada. La cama del tubo debe tener 15 cm de altura y ser uniforme para permitir que la elución ocurra rápidamente. Enjuagar el vaso con diclorometano (eluyente) e inundar el tubo abriendo la llave de teflón hasta que el líquido quede al nivel de la llave, cerrar la llave y dejar que el eluyente esté en contacto con la cama durante 5 minutos. Abrir la llave y coleccionar en el

matraz balón 200 ml del eluyente a un flujo de 5 ml por minuto. Remover el eluyente (diclorometano) sometido a destilación al vacío a 35°C y 45-50 KPa, hasta reducir el volumen a 1 ml.

Precaución: durante el paso de concentración, observar el matraz para asegurarse que no ocurra ruptura del mismo.

Con una pipeta Pasteur, transferir el extracto a un matraz aforado de 5 ml, enjuagar con porciones de 0,75 ml de tetrahidrofurano hasta obtener el volumen. Mezclar perfectamente, a esto le denominaremos muestra.

8.2.2.4 Cromatografía de gas

Condiciones de operación:

Temperatura de la columna 190°C (isotérmica)

Temperatura puerto de inyección 200°C

Temperatura del detector 250°C

Gas acarreador Nitrógeno

Flujo 50 ml/minuto

Tamaño de muestra 5 µl

Técnica estándar externo

8.2.2.5 Determinación de la curva estándar

Inyectar 5,0 µl de cada solución estándar preparadas con 4-metilimidazol y obtener los cromatogramas.

Para cada cromatograma estándar, calcular el área de pico corregida, multiplicando la altura del pico (en mm) por el ancho a la mitad de la altura del pico (en mm) por la correspondiente atenuación y por el factor dependiendo del aparato en particular y los parámetros de operación utilizados. Graficar las áreas de pico corregidas contra sus respectivas concentraciones de 4-metilimidazol y obtener así la curva. Inyectar 5,0 µl de la muestra de la misma manera que las soluciones estándar. Calcular el área del pico a interpolar para obtener el contenido de 4-metilimidazol en la muestra.

8.3 Determinación de dióxido de azufre por el método Mornier-Williams modificado.

8.3.1 Material y reactivos

Equipo Mornier-Williams modificado según la figura 1 anexa

Peróxido de hidrógeno al 3% preparado recientemente

Indicador rojo de metilo

Acido pirogálico

Hidróxido de potasio

Acido clorhídrico 4 N

Hidróxido de sodio 0,05 N

Gas nitrógeno

Agente antiespumante

8.3.2 Procedimiento

8.3.2.1 Preparación de la muestra

Instalar el equipo como se muestra en la figura 1.

Nota: es recomendable tener 2 equipos montados, ya que uno se utilizará para la muestra y el otro para el blanco de reactivos.

8.3.2.2 Para cada tubo receptor adicionar 10 ml de peróxido de hidrógeno al 3% y 3 gotas del indicador rojo de metilo. Purgar el sistema con nitrógeno durante 5 minutos, verificar que no haya fugas en las juntas y utilizar las pinzas para asegurar la instalación. En el matraz de destilación colocar 40 g de muestra y utilizar 400 ml de agua destilada para transferirla. Adicionar una gota de antiespumante.

En un segundo matraz de destilación preparar el blanco adicionando 400 ml de agua destilada y 1 gota de antiespumante.

Preparar las botellas de gas lavador adicionando a cada una de ellas una solución de piroganol (4,5 g de piroganol disuelto en 15 ml de agua destilada). Purgar el sistema con nitrógeno durante 15 minutos, adicionar una solución de KOH (65 g de KOH disueltos en 85 ml de agua) a cada botella de gas lavador y de nuevo purgar con nitrógeno. Adicionar a los matraces de destilación 90 ml de HCl 4 N mientras se continúa purgando el sistema.

El flujo de nitrógeno debe ser ajustado de manera que en las botellas lavadoras de gas se observe una corriente suave y constante de burbujas. Suministrar agua al refrigerante y someter a calentamiento los matraces de destilación para causar reflujo durante 25 minutos (90 voltios). Cuando se obtiene un reflujo continuo suministrar más calor (120 voltios) y refluja durante 105 minutos. Quitar el agua a los refrigerantes y continuar calentando hasta que el primer adaptador muestre algo de condensación. Suspender el suministro de calor y el flujo de nitrógeno, quitar el tubo receptor y vaciar su contenido en un vaso de precipitados de 250 ml. Enjuagar el tubo receptor con agua destilada y vaciar el agua en el mismo vaso de precipitados. Enjuagar cada una de las partes del sistema (refrigerante, adaptador, primer condensador y concentrador) con agua destilada y vaciarla en el vaso de precipitados (utilizar aproximadamente 175 ml). Titular todo el contenido del vaso de precipitados con NaOH 0,05 N adicionando unas gotas de rojo de metilo hasta que vire a amarillo claro pH 6,2.

Calcular el porcentaje de SO₂ con la siguiente fórmula.

$$\% \text{SO}_2 = \frac{\text{ml de NaOH} \times \text{N del NaOH} \times 3,205}{\text{g de muestra}}$$

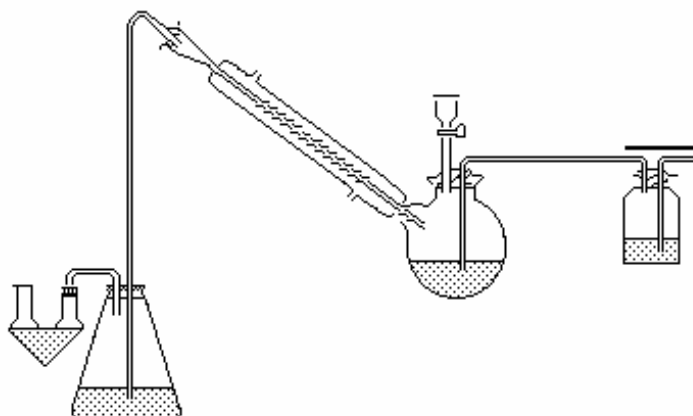


Figura 1

9.1 Determinación de ácido carmínico

9.1.1 Materiales y reactivo

Matraz aforado de 1 l

Vaso de precipitados de 250 ml

Acido clorhídrico 2 N

9.1.2 Preparación de la muestra

La muestra de rojo carmín se hidroliza con HCl para liberar todo el ácido carmínico y su absorbancia a una longitud de onda de 494 nm.

9.1.3 Procedimiento

Pesar exactamente 0,10 g de muestra en un vaso de precipitados de 250 ml, adicionar 30 ml de HCl 2 N y calentar a ebullición en baño maría durante 3-4 minutos, vaciar cuantitativamente esta mezcla en un matraz aforado de 1 l y llevar al volumen con agua destilada.

Prepare un blanco de reactivos con HCl 2 N y agua destilada en parte proporcional a lo usado para analizar la muestra. Leer la absorbancia de la solución en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 494 nm.

Calcular el porcentaje de ácido carmínico de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$A \times 100$$

$$\% \text{ Acido carmínico} = \frac{\text{-----}}{\text{-----}}$$

$$13,9 \times b \times W$$

donde:

A = Absorbancia (valor leído a 494 nm).

b = Espesor de la celda.

13,9 = Factor.

W = Peso de la muestra en g.

10. Cúrcuma

10.1 Determinación de curcumina

10.1.1 Reactivos

Acetona

Estándar de curcumina para síntesis (C₂₁H₂₀O₆)

10.1.2 Preparación del estándar

Colocar 250 mg de curcumina estándar pesados exactamente en un matraz volumétrico de 100 ml, anotar el peso en mg como w. Disolver en acetona, llevar al volumen con acetona y mezclar.

Tomar 1 ml de esta solución y colocar en un segundo matraz volumétrico de 100 ml llevar al volumen y mezclar, finalmente tomar con una pipeta 5 ml de la solución anterior, y colocarlos en un matraz volumétrico de 50 ml, llevar al volumen con acetona y mezclar.

10.1.3 Preparación de la muestra

Colocar 250 mg de muestra exactamente pesada dentro de un matraz volumétrico de 100 ml, anotar el peso en mg como W. Disolver en acetona, llevar al volumen con acetona y mezclar. Tomar 1 ml de esta solución y colocar en un segundo matraz de 100 ml, llevar al volumen con acetona y mezclar finalmente, pipetear 5 ml de la solución anterior, y colocarla en un matraz volumétrico de 50 ml, llevar al volumen con acetona y mezclar.

10.1.4 Procedimiento

Determinar la absorbancia de cada solución a 418 nm en una celda de 1 cm, usando como blanco acetona.

Calcular el por ciento de curcumina en la muestra con la siguiente fórmula:

$$100 \times w/W \times Au/As = \% \text{ de curcumina}$$

donde:

Au = Absorbancia de la muestra.

As = Absorbancia del estándar de curcumina.

w = Peso del estándar en mg.

W = Peso de la muestra en mg.

Nota: Las lecturas de absorbancia deben realizarse lo más pronto posible después de ser preparadas las soluciones para evitar pérdidas en el color.

11. Harina de semilla de algodón cocida, tostada y parcialmente desgrasada

11.1 Determinación del contenido de gopipol libre.

11.1.1 Procedimiento

Pesar 1 g de la muestra y transferirla a un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Recubra el fondo del matraz con perlas de vidrio de 6 mm de diámetro. Transferir 50 ml de una solución de acetona-agua (7:3) al matraz, tapar y agitar en un agitador mecánico durante 1 hora. Filtre esta solución a través de un papel filtro seco de porosidad media, recibiendo en un matraz pequeño y descarte los primeros ml del filtrado. Tomar 2 porciones de 10 ml del filtrado y depositar cada una de éstas en matraces volumétricos por separado de 25 ml. Llevar la primera porción al volumen con una solución de alcohol isopropílico - agua (8:2).

A la segunda alícuota agregar 2 ml de anilina redestilada y calentar en baño maría por 30 minutos. Calentar en baño maría una solución conteniendo 2 ml de anilina y 10 ml de una solución acetona - agua (7:3), quitar ambas soluciones del baño, enfriar a temperatura ambiente, y llevar al volumen con una solución de alcohol isopropílico - agua (8:2).

Medir la absorbancia de las 2 soluciones muestra y del reactivo contra el alcohol isopropílico a un máximo cercano a 460 nm.

Calcule la absorbancia corregida (diferencia entre la absorbancia de las muestras, corregidas con el blanco) y compare contra estándares preparados de manera similar.

12. Oleorresina de paprika

12.1 Determinación de capsaicina

12.1.1 Procedimiento

Pesar exactamente 5 g en un matraz, adicionar 100 ml de metanol al 70%, agitar por 30 minutos. Dejar reposar la solución por 5 minutos y filtrar. Tapar el embudo para evitar la evaporación. Los primeros 25 ml del filtrado se descartan y el resto del filtrado se mezcla bien. Distribuir esta solución en matraces de 100 ml y prepararlos de la siguiente manera:

Matraz 1 Matraz 2 Matraz 3 Matraz 4

Solución filtrada	4,00 ml	4,00 ml	--	--
Agua destilada	17,80 ml	16,80 ml	19,00 ml	18,00 ml
HCl 1 N	1,00 ml	--	1,00 ml	--
NaOH 1 N	--	2,00 ml	--	2,00 ml
Valor Determinado	A1	A2	A3	A4

Las soluciones se mezclan en los matraces con 100 ml de metanol. La absorbancia se evalúa A1-A4 , las 4 soluciones son medidas a 248 y 296 nm (lámpara de deuterio, celda de cuarzo).

Cálculos:

$$[(A2 - A1) - (A4 - A2)] \times 2500$$

a) a 248 nm----- = % de capsaicina

$$314 \times W$$

$$[(A2 - A1) - (A4 - A3)] \times 2500$$

a) a 296 nm----- = % de capsaicina

$$127 \times W$$

donde:

2500 = dilución.

314 y 127 = factores de corrección.

W = Peso de la muestra en g.

Determinaciones réplicas de (a) y (b) no pueden diferir más de 10%. Puede repetirse esta determinación.

12.2 Determinación de ASTA (American Spice Trade Association). Evaluar el color conforme al siguiente procedimiento:

12.2.1 Materiales y reactivos

Espectrofotómetro, capaz de medir exactamente la absorbancia a 460 nm

Celdillas de absorción cuadradas de 1 cm con tapón

Matraces volumétricos con tapón de vidrio esmerilado

Pipetas de vidrio de 10 ml

Papel glassine

Papel filtro Whatman No. 40 o equivalente

Acetona grado reactivo

Cristales de sulfato de amonio y cobalto

Dicromato de potasio grado reactivo

El sulfato de amonio y cobalto debe secarse por una semana en un desecador conteniendo sulfato de calcio anhidro. No es necesario un tratamiento preliminar para el dicromato de potasio.

Solución estándar de color: 0,3005 g/l de dicromato de potasio, más 34,96 g/l de cristales de sulfato de amonio y cobalto en una solución de H₂SO₄ 1,8 M. La absorbancia de esta solución en una celdilla de 1 cm a 460 nm podría ser 0,600.

12.2.3 Procedimiento

Pesar exactamente una muestra de 50 a 80 mg en un matraz volumétrico de 100 ml y llevar al volumen con acetona. Hacer la extracción en un tiempo mínimo de 15 minutos, agitando ocasionalmente. Con una pipeta de 10 ml, transferir 10 ml del extracto en otro matraz volumétrico de 100 ml y llevar al volumen con acetona. Filtrar el extracto diluido usando papel Whatman No. 40; desechar 10 a 15 ml del primer filtrado. Decantar una porción del filtrado en una celdilla y medir la absorbancia a 460 nm, usando acetona como blanco.

Determinar la absorbancia de la solución estándar de color a 460 nm.

Cálculos:

$$C = \frac{A \times 164 \times If}{W \times As}$$

donde:

C = Valor de color extraído ASTA.

A = Absorbancia de extracto de acetona a 460 nm.

W = peso de la muestra en g.

If = 0,600/As longitud de la celda y factor de corrección del instrumento.

As = Absorbancia de la solución estándar de color.

12.3 Determinación de solventes residuales

Este procedimiento es para la determinación de residuos de acetona, dicloruro de etileno, hexano, isopropanol, metanol, diclorometano y tricloroetileno.

12.3.1 Materiales y reactivos

Cabeza de destilación

Trampa Clevenger diseñada para usarse con aceites más pesados que el agua. Diseño en la figura No. 2

Tolueno. El tolueno usado para este análisis no debe contener alguno de los solventes a determinar por este método. La pureza puede determinarse por cromatografía de gas utilizando una de las siguientes columnas o sus equivalentes:

17% en peso de UCON 75-H-90 000 sobre una malla 35/80

20% de UCON LB-135 sobre una malla 35/80

15% de UCON LB-1715 sobre una malla 60/80 o sobre una malla de 50/60

Siga las condiciones descritas en el procedimiento e inyecte la misma cantidad de tolueno como la inyectora en el análisis de los solventes. Si las impurezas interfieren con la prueba aparecerán como picos presentes antes del pico del tolueno y podrían ser removidos por destilación fraccionada.

Benceno. El benceno usado para este análisis debe estar libre de impurezas que interfieran; la pureza puede ser determinada como se describió para tolueno.

Detergente y Antiespumante

Deben ser utilizados productos libres de compuestos volátiles. Si estos compuestos están presentes, pueden ser removidos por ebullición prolongada de las soluciones acuosas de los productos.

12.3.2 Solución de referencia A

Prepare una solución de tolueno conteniendo 2,5 g/kg de benceno. Si el tolueno disponible contiene benceno como única impureza el nivel de este último puede ser determinado por cromatografía de gas y agregue suficiente benceno hasta alcanzar el nivel o la concentración de 2,5 g/kg.

12.3.3 Solución de referencia B

Prepare una solución conteniendo 0,63% de acetona en agua.

12.3.4 Preparación de muestra A (todos los solventes excepto metanol)

Coloque 50 g de la muestra, 1 ml de la solución de referencia A, 10 g de sulfato de sodio (Na_2SO_4) anhidro, 50 ml de agua y una pequeña cantidad de detergente y antiespumante en un matraz de fondo redondo con un cuello de vidrio rugoso (de grano) de 20/40. Fije en la cabeza del cuello un destilador con un condensador enfriado con agua de 400 mm y un recipiente en el que recupere aproximadamente 15 ml del destilado. Agregue al destilado 15 g de carbonato de potasio (K_2CO_3) anhidro, agite mientras se enfría y permita la separación de fases. Todos los solventes excepto metanol estarán presentes en la fase de tolueno, la cual es usada en el procedimiento. Separe la fase acuosa para usarla en la preparación de la muestra B.

12.3.5 Preparación de la muestra B (sólo metanol)

Coloque la fase acuosa obtenida de la preparación de la muestra A en un matraz de destilación de fondo redondo de 50 ml con el cuello de vidrio rugoso 24/40, agregue unas cuantas piedras de ebullición y 1 ml de la solución de referencia B y recuperar aproximadamente 1 ml del destilado, el cual contendrá algo de metanol de la muestra junto con acetona como un patrón interno (de referencia). El destilado se usa en el procedimiento.

12.3.6 Procedimiento

Use un equipo de cromatografía de gas con un detector eléctrico y un sistema de inyección de muestra o inyección en columna. En condiciones típicas, el instrumento contiene una columna de 63 mm por 183 a 244 cm, mantenida isotérmicamente entre 70 y 80 °C. La tasa de flujo del gas acarreador es de 50 a 80 ml/minuto y el tamaño de la muestra es de 15 a 20 μl (para el detector eléctrico).

Las columnas A, B, C y D como se describen en tolueno pueden ser usados como sigue:

A Esta columna separa acetona y metanol de sus respectivas soluciones acuosas. Puede ser usada para separar y analizar hexano, acetona incluso etileno en la fase de tolueno a partir de la preparación de la muestra A. EL orden de elución es acetona, metanol y agua o hexano, acetona, isopropanol, diclorometano, benceno, tricloroetileno y dicloruro de etileno en tolueno.

B Esta columna separa diclorometano e isopropanol. El orden de elución es hexano más acetona, diclorometano, isopropanol, benceno, tricloroetileno en tolueno.

C Esta es la mejor columna para propósitos generales, excepto para la determinación de metanol. El orden de elución es hexano, acetona, benceno en tolueno.

D Esta columna es usada para la determinación de metanol el cual eluye justo antes del pico grande de agua.

Calibración.

Determine la respuesta del detector para radios conocidos de solventes por medio de la inyección de mezclas conocidas de solventes y de benceno en tolueno. Los niveles de solvente y de benceno en tolueno deben ser de la misma magnitud que los presentes en la muestra bajo análisis.

Cálculo:

Calcule las áreas de los solventes respecto al benceno y después calcule el factor de calibración F como sigue:

Peso del solvente Area del benceno

$$F (\text{solvente}) = \frac{\text{Peso del solvente}}{\text{Peso del benceno}} \times \frac{\text{Area del benceno}}{\text{Area del solvente}}$$

Peso del benceno Area del solvente

La recuperación de varios solventes de la muestra respecto a la recuperación del benceno es como sigue:

Hexano 52%

Acetona 85%

Isopropanol 100%

Diclorometano 87,5%

Tricloroetileno 113%

Metanol 87%

Calcule los mg/kg de solventes residuales (excepto metanol) por la siguiente fórmula:

$$43.4 \times F \text{ solvente} \times 100 \frac{\text{Area del solvente}}{\text{Area del benceno}}$$

$$\text{Solvente residual} = \frac{\text{43,4} \times F \text{ solvente} \times 100 \times \text{Area del solvente}}{\text{Area del benceno}}$$

% del solvente recuperado Area del benceno

donde:

43,4 = mg/kg del patrón interno de benceno relacionado a 50 g de muestra para análisis.

Calcule los mg/kg de metanol residual por la fórmula:

$$100 F \frac{\text{Area del metanol}}{\text{Area de la acetona}}$$

$$\text{Metanol residual} = \frac{100 F \times \text{Area del metanol}}{\text{Area de la acetona}}$$

0,87 Area de la acetona

donde:

100 = Concentración en mg/kg del patrón interno de acetona relacionado a una muestra de 50 g.

F = Factor de calibración para metanol determinado por el uso de una mezcla conocida de metanol y acetona.

13.3 Determinación de riboflavina libre y riboflavina difosfato

13.3.1 Preparación del estándar

Transferir 35 mg de riboflavina estándar de referencia en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, adicionar 20 ml de piridina, 75 ml de agua y disolver la riboflavina con agitación frecuente. Transferir la solución a un matraz volumétrico de 1 000 ml y llevar al volumen con agua y mezclar. Transferir 20 ml de esta solución a un segundo matraz volumétrico, de 1 000 ml, ajustar el pH a 6,0 con la adición de 8 ml de H₂SO₄ 0,1 N, llevar al volumen con agua y mezclar. Finalmente, transferir 25 ml de la última solución a un matraz volumétrico de 100 ml, llevar a volumen con una mezcla de dioxano - agua (1:3), y mezclar. Esta solución contiene 0,175 µg de riboflavina por ml.

13.3.2 Solución buffer

Disolver 15,6 g de fosfato monopotásico (NaH₂PO₄·2H₂O) en 100 ml de agua, adicionar 59,3 ml de hidróxido de sodio 1 N y diluir a 2000 ml con agua. Verificar el pH con un potenciómetro y ajustar a 7 si es necesario.

13.3.3 Preparación de la muestra

Disolver 100 g de la muestra en 10 ml de solución buffer pH 7. Prepare una tira de papel Whatman cromatografía tipo 3 mm, de coeficiente de corrimiento medio u otro equivalente en papel para electroforesis y saturar el papel con solución buffer de pH 7. Usando una micropipeta aplicar 0,01 ml de la solución muestra a lo largo de la línea angosta del lado del cátodo, quedando el papel del lado que contiene la muestra. Aplique un potencial de aproximadamente 250 volts, deje que la electroforesis continúe por 6 horas y remueva el papel de la cámara.

Detectar alguna riboflavina libre o difosfato de riboflavina, observando la línea a la luz del día o bajo luz ultravioleta. Si existe riboflavina libre, aparecerá como una banda cercana a la línea de inicio, y el difosfato de riboflavina aparecerá como la línea más alejada de la línea de inicio.

Precaución. La riboflavina se destruye si es expuesta a la luz ultravioleta por más de unos segundos.

Corte las bandas respectivas, colocándolas en matraces Erlenmeyer de 250 ml por separado, conteniendo 35,0 ml de una mezcla de dioxano-agua (1:3), y permitiendo que se establezca hasta que se eluyan completamente las manchas de las franjas.

13.3.4 Procedimiento

Usando un fluorómetro disponible, determine la intensidad de la fluorescencia de cada solución muestra y del estándar a una longitud de 530 nm, utilizando una longitud de onda de excitación de 460 nm.

La fluorescencia de las soluciones conteniendo la riboflavina y el difosfato de riboflavina, no serán mayores que las producidas por la preparación estándar.

13.4 Determinación de lumiflavina

13.4.1 Reactivo

Para preparar el estándar, diluir en un matraz volumétrico de 1 000 ml, 3 ml de dicromato de potasio 0,1 N y llevar al volumen con agua.

Pase algo de cloroformo a través de una columna de alúmina para remover cualquier resto de etanol. Para 10 ml de este cloroformo, agregue 35 mg de la muestra, agite 5 minutos y filtre. El color del filtrado no debe ser más intenso que el de 10 ml de la preparación estándar cuando es visto en recipientes idénticos.

13.4.2 Procedimiento

Realice la prueba bajo luz tenue. En un matraz volumétrico de vidrio color ambar de 500 ml, disuelva 10 mg de muestra en 100 ml de agua y agregue 2,5 ml de ácido acético glacial y en un matraz volumétrico de 500 ml llevar al volumen con agua. Coloque 20,0 ml de esta solución en un matraz volumétrico de vidrio color ámbar, agregue 3,5 ml de una solución 1,4% p/v de acetato de sodio y llevar a 200 ml con agua.

Mida la absorbancia (A) a un máximo de 444 nm.

A x 5000

% Total de materias colorantes = ----- x 1,367

328 x W

Donde: A= Absorbancia de la muestra a 444 nm.

W= Masa de la muestra en g.

13.5 Determinación de anilina

13.5.1 Procedimiento

Disolver 20 g de la muestra en 400 ml de agua y añadir 5 ml de NaOH 1 N. Agitar en un embudo de separación y separar con 4 porciones sucesivas de 50 ml de cloroformo, cada vez durante 5 minutos. Con porciones sucesivas de 400 ml de NaOH 0,1 N, lavar los extractos clorobencénicos reunidos hasta que la capa acuosa superior sea incolora. Filtrar la solución clorobencénica. Tomar 75 ml de extracto clorobencénico agitar con 2 porciones sucesivas de 50 ml de HCl 0,5 N, y luego con 2 porciones sucesivas de 25 ml de agua. Neutralizar los extractos acuosos reunidos con una solución de NaOH al 30%; luego acidificar con 10 ml de HCl 0,5 N. Disolver en esta solución de 1-2 g de bromuro de potasio. Después de enfriar en agua helada añadir alrededor de 20 gotas de nitrato de sodio 0,1 N y dejar reposar durante 10 minutos. Eliminar el exceso de nitrato añadiendo ácido aminosulfónico. Verter la solución en unos 5 ml de una solución al 3% de sal R(sal sódica del ácido naftol-2-sulfónico-3,6) adicionado con 10 ml de NaOH 2 N. Dejar reposar durante 15 minutos. Acidificar la solución de colorante en presencia de rojo congo (indicador), hasta que éste vire al azul y filtrar. El colorante aminobencénico no pasará.

Añadir agua al filtrado hasta 200 ml; luego medir la extinción a 490 nm (E4).

13.5.2 Cálculo

E4 x 266

Contenido en anilina = -----

(mg/kg) 2,26 x d4

1mg/ml

E ----- 490 para anilina = 226

1 cm

14. Guanina

14.1 Determinación de guanina e hipoxantina

14.1.1 Materiales y reactivos

Matraces volumétricos de 1 000, 500 y 100 ml

Filtros de fibra de vidrio 934 AH

Matraz Erlenmeyer de 250 ml

Crisol Gooch No.4

Placa para calentar con agitador magnético

Barra magnética para agitar

Filtro de vidrio medio poroso

Vaso de precipitados de 200 ml de forma larga

Matraz de succión

Vidrio de reloj

Filtro Fisher

Agitador de vidrio

Pipetas de 5 y 50 ml

Espectrofotómetro ultravioleta cubriendo un rango de espectro de 300 nm a 230 nm con escala de longitud de onda capaz de leer a 1 nm y absorbancia con una exactitud de 1% de error absoluto

Celdas de absorción de cuarzo de 1 cm

Solución buffer de carbonato-bicarbonato

Disolver 13,44 g de bicarbonato de sodio (grado reactivo) y 45,75 g de carbonato de sodio anhidro en agua destilada y diluir a un litro

Filtro de tierra de diatomáceas, previamente lavado con agua-acetona (1:1) y secado

Acetona grado suprapuro

Solución de hidróxido de sodio 1 N

Cristales anhidros de guanina

Cristales anhidros de hipoxantina

Preparación del blanco

En un matraz volumétrico de 100 ml diluir 5 ml de NaOH de sodio 1 N con agua, llevar al volumen y mezclar. Transferir una alícuota de 10 ml a un matraz volumétrico de 1 000 ml, añadir 50 ml de solución buffer de carbonato-bicarbonato y llevar al volumen con agua.

14.1.2 Preparación del estándar

Pesar exactamente 150 mg de guanina cristalizada anhidra (secada a 105°C) y 136 mg de hipoxantina (secada a 105°C) en dos matraces volumétricos de 100 ml por separado. Añadir 5 ml de NaOH 1 N y calentar en baño de vapor para facilitar la disolución. Enfriar y llevar al volumen con agua. Transferir una alícuota de 10 ml a un matraz volumétrico de 1 000 ml añadir 50 ml de solución buffer de carbonato-bicarbonato y llevar al volumen con agua.

Medir la absorbancia de cada solución final a 273 y 259 nm en celdas de 1 cm contra el blanco.

Calcular E 1% 1cm evaluando ambas longitudes de onda para ambos estándares. Hacer varias determinaciones y sacar el valor promedio para ser utilizado en los cálculos. Una vez que el coeficiente de extinción del estándar ha sido determinado, éste necesita ser verificado periódicamente.

14.1.3 Preparación de la muestra

Pesar exactamente una cantidad apropiada de muestra (1g para un 10% de mezcla) del colorante (mezclada perfectamente) dentro de un vaso de precipitados de forma larga de 200 ml. Añadir acetona para dispersar la muestra y filtrar aproximadamente 4 g. Mezclar bien. Filtrar a través de un crisol Gooch No. 4 conteniendo filtro de fibra de vidrio. Lavar el vaso de precipitados y filtrar perfectamente con acetona mientras se va filtrando, permitiendo pasar completamente antes de lavar de nuevo. Repetir 4 veces el lavado con acetona. Entonces lavar el vaso de precipitados con agua para remover algún residuo de acetona.

14.1.4 Procedimiento

Transferir cuantitativamente el filtrado al fondo de un vaso de precipitados de forma larga de 200 ml, colocar una barra de agitación magnética. Lavar el crisol perfectamente con agua, adicionando el agua de lavado al vaso de precipitados. Adicionar de 80 a 90 ml de agua y remover el material filtrado con agitación. Añadir 5 ml de NaOH 1 N,

cubrir con un vidrio de reloj, calentar a ebullición agitando magnéticamente por 90 minutos. Con la ayuda del agua y un filtrador Fisher, filtrar la muestra caliente a través de un filtro de vidrio poroso conteniendo un filtro de ayuda, dentro de un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Lavar el vaso de precipitados y el filtro de vidrio perfectamente con agua hasta que el volumen del filtrado esté claro, aproximadamente de 100 a 150 ml.

Transferir el filtrado cuantitativamente con ayuda de agua a un matraz volumétrico de 500 ml, enfriar y llevar al volumen con agua.

Medir la absorbancia de la solución a 273 nm en una celda de 1 cm contra el blanco.

Cálculos:

Coeficiente de extinción del estándar

A

E1% 1cm = -----

C x l

donde:

A= Absorbancia a longitud de onda específica.

C= Concentración % (p/v).

l= Longitud de onda en cm.

Concentración de guanina e hipoxantina en la solución problema:

(A273 x Eh259) - (A359 x Eh273)

Cg = -----

(Eg273 x Eh259) - (Eg259 x Eh273)

(A259 x Eg273) - (A273 x Eg259)

Cg = -----

(Eg273 x Eh259) - (Eh259 x Eh273)

donde:

Cg= Concentración de guanina en % (p/v).

Ch= Concentración de hipoxantina en % (p/v).

A = Absorbancia a longitud de onda especificada.

Eg= Coeficiente de extinción del estándar de guanina a longitud de onda especificada.

Eh= Coeficiente de extinción del estándar de hipoxantina a longitud de onda especificada.

Guanina e hipoxantina en la muestra:

Cg x DF

% Guanina (p/p) = -----

w

Ch x DF

% Hipoxantina (p/p) = -----

w

donde:

Cg = Concentración de guanina en la solución problema.

Ch = Concentración de hipoxantina en la solución problema.

DF = Factor de dilución en ml.

w = Peso de la muestra en g.