

**NMX-Y-333-SCFI-2004**

**PRODUCTOS PARA USO AGROPECUARIO - INGREDIENTES  
DE ALIMENTOS BALANCEADOS PARA ANIMALES - VITAMINA  
B2 (RIBOFLAVINA) - ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE  
PRUEBA**

**PRODUCTS FOR AGRICULTURAL USE - BALANCED FEED  
INGREDIENTS FOR ANIMALS - VITAMIN B2 (RIBOFLAVIN) -  
SPECIFICATIONS Y TEST METHOD**

## 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 TRANSFORMACIÓN  
Sección 49 Fabricantes de Alimentos Balanceados para Animales.
  
- COMITÉ TÉCNICO DE NORMALIZACIÓN NACIONAL DE ALIMENTOS  
PARA ANIMALES
  
- DEGUSSA MÉXICO, S.A. DE C.V.
  
- ROCHE VITAMINAS MÉXICO, S.A. DE C.V.

## NMX-Y-333-SCFI-2004



### **PRODUCTOS PARA USO AGROPECUARIO - INGREDIENTES DE ALIMENTOS BALANCEADOS PARA ANIMALES - VITAMINA B2 (RIBOFLAVINA) - ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA**

### **PRODUCTS FOR AGRICULTURAL USE - BALANCED FEED INGREDIENTS FOR ANIMALS - VITAMIN B2 (RIBOFLAVIN) - SPECIFICATIONS Y TEST METHOD**

#### **1 OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN**

Esta norma mexicana establece las especificaciones y métodos de prueba que debe cumplir la vitamina B2 (riboflavina), para ser utilizada como ingrediente en alimentos balanceados para animales que se comercializa en territorio nacional.

#### **2 REFERENCIAS**

Para la correcta aplicación de esta norma, se deben consultar la siguiente norma oficial mexicana y norma mexicana vigentes o las que las sustituyan:

- |                     |   |
|---------------------|---|
| NOM-012-ZOO-1993    | Especificaciones para la regulación de productos químicos, farmacéuticos, biológicos y alimenticios para uso en animales o consumo por éstos, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 17 de enero de 1995, con modificaciones el 3 de junio de 1998 y 27 de enero de 2004. |
| 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

Se encuentra en tres formas: riboflavina libre de dinucleótidos y los dos derivados de coenzimas; el mononucleótido flavina (FMN) y el dinucleótido flavina adenina (FAD). Es producida por fermentación a partir de un microorganismo genéticamente modificado. La riboflavina está purificada y libre de DNA. La vitamina B2 es sintetizada por las plantas verdes, levaduras, hongos y algunas bacterias.

### 4 CLASIFICACIÓN

La vitamina B2 (riboflavina) se clasifica dentro del grupo de las vitaminas hidrosolubles y se puede identificar como:

- a) Riboflavina
- b) Lactoflavina
- c) Vitamina B2

### 5 ESPECIFICACIONES

La vitamina B2 (riboflavina) debe cumplir las especificaciones que se indican en la tabla 1.

**TABLA 1.- Especificaciones**

<b>Especificaciones</b>	<b>Características</b>
Contenido activo	Min. 80 %
Olor	Característico del producto
Color	Amarillo a anaranjado
Aspecto o presentación	Polvo fino o granular
Solubilidad	Ligeramente soluble en agua
Pérdida por secado a 105°C / 4h ó Contenido de agua (Karl Fischer)	Máximo 3 % Máximo 5 %
Tamaño de partícula / granulometría Polvo fino Granular	Máx. 5 % a través de malla # 270 Mín. 95 % < 0,35 mm

## 6 MUESTREO

El muestreo se debe basar en lo dispuesto en la norma oficial mexicana NOM-012-ZOO (ver 2 Referencias).

Asimismo, también se puede basar en lo establecido en la norma mexicana NMX-Y-111-SCFI (ver 2 Referencias).

## 7 MÉTODOS DE PRUEBA

Para la comprobación de las especificaciones que se establecen en esta norma, se deben aplicar los siguientes métodos, mismos que son alternativos:

7.1 Determinación de contenido de vitamina B2 (riboflavina) - Método por espectrofotometría de UV/VIS

7.1.1 Equipo

- Espectrofotómetro;
- Celdas de cuarzo;
- Matraces volumétricos de 1 000 ml, 200 ml;
- Pipeta volumétrica de 25 ml, y
- 2 Pipetas graduadas de 5 ml.

7.1.2 Condiciones

Longitud de onda: 444 nm  
Lámpara de visible

7.1.3 Reactivos

- Hidróxido de sodio 1 N;
- Ácido acético (100 %);
- Acetato de sodio 0,1 N, y
- Agua destilada.

#### 7.1.4 Procedimiento

En un matraz volumétrico de 1 000 ml suspender aproximadamente 120 mg (pesados con exactitud) en 50 ml de agua destilada. Adicionar 5 ml de hidróxido de sodio 1 N y disolver durante 1 min. Inmediatamente adicionar aproximadamente 800 ml de agua destilada; 1 ml de ácido acético (100 %) y aforar con agua destilada.

Pipetear 25 ml de esta solución a un matraz volumétrico de 200 ml, adicionar 3,5 ml de acetato de sodio 0,1 N y aforar al volumen con agua destilada.

Medir la absorbancia de esta solución en celdas de cuarzo de 1 cm a 444 nm (medida del máximo), usando un espectrofotómetro.

Una solución idénticamente preparada es usada como blanco.

#### 7.1.5 Expresión de resultados

$$\text{Contenido en \%} = \frac{A_{444} (8000)}{W (328)}$$

donde:

$A_{444}$  es la absorbancia a 444 nm;  
 $W$  es el peso en gramos, y  
328 es A (1 %, 1 cm) valor de riboflavina.

### 7.2 Determinación del contenido de riboflavina pura por HPLC

#### 7.2.1 Alcance

El método es aplicable para determinaciones mayores de 50 % de riboflavina pura.

#### 7.2.2 Principio

La solución de la vitamina es sometida al HPLC en una columna C-18 con detector a 280 nm. La riboflavina contenida es cuantificada por comparación con una solución estándar tratada similarmente.

### 7.2.3 Tiempo requerido

Asignar 2,0 h para preparar y extraer las soluciones de muestra y estándar. Asignar 4,0 h para el HPLC para una muestra por duplicado. Tiempo total 6,0 h. Asignar 3,0 h para cada muestra adicional por duplicado.

### 7.2.4 Reactivos y materiales

- Sal de sodio del ácido 1-heptanosulfónico grado HPLC;
- EDTA grado p.a.;
- Trietilamina grado p.a.;
- Ácido acético glacial grado p.a.;
- Metanol grado HPLC;
- Riboflavina estándar de referencia o estándar secundario establecido agua grado HPLC;
- Matraces volumétricos de 500 ml y 2 000 ml;
- Pipetas volumétricas de 5 ml, 20 ml y 100 ml;
- Probeta de 250 ml;
- Embudos de vidrio;
- Viales para HPLC;
- Kit de clarificación de solventes para HPLC;
- Kit de filtración de muestras para HPLC;
- Jeringa de 50 ó 100 microlitros, y
- Loop de 50 microlitros.

### 7.2.5 Instrumentos y equipos

- Balanza analítica con precisión de 0,1 mg;
- Sistema HPLC con detector de arreglo de diodos o UV/VIS a 280 nm;
- Columna HPLC Waters Resolve C-18 de 5 micras, 10 cm x 8,0 mm o equivalente;
- Baño ultrasónico con control de temperatura;
- Bomba de vacío, y
- Potenciómetro.

### 7.2.6 Seguridad

La trietilamina es flamable: manejar lejos de fuentes de calor, usar solamente en espacios ventilados bajo campana de extracción. Evitar contacto con la piel y los ojos. El ácido acético glacial puede causar severas quemaduras y es flamable, usar solamente en espacios ventilados con campana de extracción, usar guantes y gafas de seguridad. El metanol es flamable y tóxico. No inhalar vapores y evitar contacto con la piel.

#### 7.2.7 Condiciones HPLC

Detector: UV-VIS o arreglo de diodos a 280 nm

Velocidad de flujo: 1,0 ml/min

Volumen de inyección: 50 microlitros

Número de inyecciones: 4

Tiempo de corrida: 20 min

#### 7.2.8 Descripción de la actividad

Preparación de la fase móvil.

- 1 A un matraz volumétrico de 2 000 ml adicionar 2,20 g de la sal de sodio del ácido 1-heptano sulfónico, 0,1 g de EDTA y 1 200 ml de agua grado HPLC.
- 2 Pipetear 20 ml de trietilamina en la solución anterior.
- 3 Adicionar 90 ml, de ácido acético glacial para ajustar a un pH de 3,60 + 0,05 (medidos con pipetas volumétricas; 50 ml y 20 ml).
- 4 Adicionar 250 ml de metanol grado HPLC, medidos con probeta y aforar con agua grado HPLC.
- 5 Filtrar la solución para HPLC y degasificar.

#### 7.2.9 Preparación del estándar y la muestra

La muestra se prepara por duplicado y se le da el mismo tratamiento al estándar y a la muestra.

- 1 En un papel encerado pesar analíticamente 20 mg de Riboflavina estándar de referencia (con precisión de 0,1 mg).
- 2 Transferir cuantitativamente a través de un embudo a un matraz volumétrico ámbar de 500 ml y aforar con la solución de la fase móvil.
- 3 Sonificar por 15 min en baño ultrasónico a 40°C - 50°C y agitar vigorosamente invirtiendo el matraz, sonificar por 15 min más.
- 4 Filtrar para HPLC la solución y depositar en un vial; inyectar 2 veces en el sistema HPLC.



7.2.10 Cálculos

$$\% \text{ de Riboflavina} = \frac{Aa / Wa \times P}{As / Ws}$$

donde:

Aa es el área del pico de la muestra;  
As es el área del pico del estándar;  
Wa es el peso de la muestra en gramos;  
Ws es el peso del estándar en gramos, y  
P es la pureza de la riboflavina en el estándar (en %).

**8 ESTABILIDAD**

La que garantice el fabricante en la etiqueta.

**9 MARCADO, ETIQUETADO, ENVASE, EMPAQUE Y EMBALAJE**

El producto objeto de la aplicación de esta norma debe cumplir con lo establecido en la norma oficial mexicana NOM-012-ZOO (ver 2 Referencias).

**10 ALMACENAMIENTO**

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

**11 BIBLIOGRAFÍA**

NOM-008-SCFI-2002 Sistema general de unidades de medida, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 27 de noviembre de 2002.

REFERENCIA BASF Corporation. Standar Technical Instructions. Método No.6245.

**12 CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES**

Esta norma mexicana no es equivalente a ninguna norma internacional por no existir referencia alguna al momento de su elaboración.

**México D. F., a**

**MIGUEL AGUILAR ROMO.  
DIRECTOR GENERAL.**