

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

COMENTARIOS

Con fundamento en el numeral 6.3.3.1 de la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SSA1-2020, se publica el presente proyecto a efecto de que los interesados, a partir del 1º de agosto y hasta el 30 de septiembre de 2022, lo analicen, evalúen y envíen sus observaciones o comentarios en idioma español y con el sustento técnico suficiente ante la CPFEUM, sito en Río Rhin número 57, colonia Cuauhtémoc, código postal 06500, Ciudad de México.

Correo electrónico: consultas@farmacopea.org.mx.

DATOS DEL PROMOVENTE

Nombre: _____
Institución o empresa: _____
Teléfono: _____

Cargo: _____
Dirección: _____
Correo electrónico: _____

EL TEXTO EN COLOR ROJO HA SIDO MODIFICADO

Dice	Debe decir	Justificación*
MPB 0860. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS		
MÉTODO DE ABSORCIÓN DE LUZ ULTRAVIOLETA A 280 nm		
Las proteínas en solución absorben luz ultravioleta a una longitud de onda de 280 nm debido a la presencia de aminoácidos aromáticos en la estructura proteica, principalmente tirosina, triptofano y fenilalanina. Esta propiedad puede ser usada para propósitos de ensayo. Puede utilizarse agua o solución amortiguadora para disolver la proteína, el mismo disolvente será utilizado para compensar el espectrofotómetro. Se recomienda preparar soluciones concentradas de la proteína o utilizar detergentes no iónicos en la preparación para evitar pérdidas por adherencia a la celda.		

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>Solución de prueba. Disolver una cantidad adecuada de la sustancia a examinar en agua o en el disolvente indicado para obtener una solución que contenga una concentración de proteínas entre 0.2 y 2 mg/mL.</p> <p>Solución de referencia. Preparar una solución de una sustancia de referencia adecuada para la proteína a determinar en el mismo disolvente y a la misma concentración de proteína que la solución de prueba.</p> <p>Blanco. Usar el mismo disolvente empleado para la preparación de la solución de prueba y las soluciones de referencia.</p> <p>Procedimiento. Mantener la solución de prueba, la solución de referencia y el blanco a la misma temperatura durante la ejecución del ensayo. Determinar las absorbancias, de la solución de prueba y la de referencia en celdas de cuarzo a 280 nm, (MGA 0361, <i>Espectrofotometría visible y ultravioleta</i>), usando el blanco para el ajuste a cero. La respuesta es lineal en el intervalo de concentraciones de la proteína en prueba, para obtener resultados precisos.</p>		
<p>Dispersión de luz. La exactitud en la determinación de proteínas puede ser disminuida debido a la luz dispersada por la muestra de prueba. Si las proteínas en solución existen como partículas comparables en tamaño a la longitud de onda de la luz usada para la medición (250 a 300 nm), la dispersión de la luz emite resultados con un incremento aparente en la absorbancia de la muestra de prueba. Para calcular la absorbancia</p>		

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>a 280 nm debida a la dispersión de la luz, determinar la absorbancia de la solución de prueba a una longitud de onda de 320, 325, 330, 335, 340, 345 y 350 nm. Graficar el logaritmo de la absorbancia contra el logaritmo de la longitud de onda y obtener por regresión lineal la mejor curva de calibración. Extrapolar la curva para determinar el logaritmo de la absorbancia a 280 nm. El antilogaritmo de este valor es la absorbancia atribuida a la dispersión de la luz. Corregir los valores observados restando la absorbancia correspondiente a la dispersión de la luz de la absorbancia total a 280 nm para obtener el valor de la absorbancia de la proteína en solución. La filtración con un tamaño de poro de 0.2 µm que no adsorba proteína o la clarificación por centrifugación puede conducir a reducir el efecto de la dispersión de la luz, especialmente si la solución es notablemente turbia.</p>		
<p>Cálculos. Usar los valores corregidos para los cálculos. Calcular la concentración de proteína en la solución de prueba (C_p) a partir de la siguiente ecuación:</p>		
$C_p = C_s \left(\frac{A_u}{A_s} \right)$		
<p>Donde: C_p = Concentración de la solución de prueba. C_s = Concentración de proteína en la solución de referencia.</p>		

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p><i>Au</i> y <i>As</i> = Absorbancias corregidas de la solución de prueba y la de referencia, respectivamente.</p>		
<p>MÉTODO DE LOWRY</p>		
<p>MÉTODO A Este método se basa en la reducción de la mezcla cromógena de ácido fosfomolibdotúngstico por la proteína en el Reactivo fosfomolibdotúngstico, lo cual origina una absorbancia máxima a 750 nm. El Reactivo fosfomolibdotúngstico reacciona principalmente con los residuos de tirosina de la proteína. El desarrollo de color alcanza su máximo entre 20 y 30 min a una temperatura entre 20 y 25 °C, después de los cuales hay una pérdida gradual del color. Debido a que el método es sensible a sustancias interferentes, puede usarse un método para precipitar la proteína de la muestra por analizar. La mayoría de las sustancias interferentes causan una disminución del color, sin embargo, algunos detergentes causan un ligero incremento en el color. Una elevada concentración de sales puede originar un precipitado. En caso de que sea necesario separar las sustancias interferentes de la proteína de prueba, el efecto de sustancias interferentes podría ser disminuido mediante dilución, siempre y cuando la concentración de la proteína de prueba quede en cantidad suficiente para una determinación exacta.</p>		
<p>Solución de prueba. Disolver una cantidad adecuada de la sustancia a examinar en la solución amortiguadora prescrita, para obtener una solución que contenga una concentración dentro</p>		

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>del intervalo de la curva de referencia. Una solución amortiguadora adecuada, producirá una solución con pH entre 10.0 y 10.5.</p> <p>Soluciones de referencia. Disolver la sustancia de referencia para la proteína a determinar en la solución amortiguadora prescrita. Diluir porciones de esta solución en la misma solución amortiguadora, para obtener no menos de cinco soluciones de referencia, teniendo concentraciones de proteína igualmente separadas entre sí, en un intervalo adecuado entre 5 y 100 µg/mL.</p> <p>Blanco. Usar la solución amortiguadora empleada para la preparación de la solución de prueba y las soluciones de referencia.</p> <p>Reactivo de sulfato de cobre. Disolver 0.1 g de 9y 0.2 g de tartrato de sodio en agua destilada y llevar a 50 mL con la misma agua. Disolver 10 g de carbonato de sodio anhidro en agua destilada y diluir a 50 mL con el mismo solvente. Verter lentamente la solución de carbonato de sodio a la solución de sulfato de cobre mezclando. Usar dentro de las 24 h siguientes.</p>		
<p>Reactivo de cobre alcalino. Mezclar un volumen de reactivo de sulfato de cobre, dos volúmenes de una solución de dodecil sulfato de sodio al 5.0 % (p/v) y un volumen de una solución de hidróxido de sodio al 3.2 % (p/v). Mantener a una temperatura entre 20 y 25 °C. Usar dentro de las 2 semanas siguientes.</p> <p>Reactivo fosfomolibdotúngstico diluido. Mezclar 5 mL del reactivo fosfomolibdotúngstico con 55 mL</p>		

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>de agua destilada. Almacenar en un frasco ámbar a una temperatura entre 20 y 25 °C.</p> <p>Procedimiento. Mezclar 1.0 mL de Reactivo de cobre alcalino con 1.0 mL de cada solución de referencia, de la solución de prueba y del blanco. Dejar reposar durante 10 min. Añadir 0.5 mL del Reactivo fosfomolibdotúngstico diluido, mezclar y dejar reposar 30 min a una temperatura entre 20 y 25 °C. Determinar las absorbancias de las soluciones a 750 nm de acuerdo al <i>MGA 0361, Espectrofotometría visible y ultravioleta</i>, usando la solución blanco para el ajuste a cero.</p>		
<p>Cálculos. La relación entre absorbancia y la concentración de proteína no es lineal; sin embargo, si el intervalo de concentraciones usado para preparar la curva de calibración de referencia es suficientemente pequeño, en la parte final puede acercarse a la linealidad. Graficar las absorbancias de las soluciones de referencia contra las concentraciones de proteína y usar la regresión lineal para establecer la curva de referencia, y a partir de esta y de la absorbancia de la solución de prueba, determinar la concentración de proteína en la solución de prueba, multiplicando por el factor de dilución de la muestra.</p>		
<p>Sustancias interferentes. En el siguiente procedimiento, se adiciona ácido tricloroacético desoxicolato a la muestra de prueba para eliminar sustancias interferentes por precipitación de proteínas antes de la determinación; esta técnica también puede ser usada para concentrar</p>		

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>proteínas de una solución diluida. Adicionar 0.1 mL de una solución de desoxicolato de sodio a una concentración de 1.5 g/L a 1 mL de una solución de la sustancia a evaluar. Mezclar usando vórtex y dejar reposar por 10 min a temperatura ambiente. Añadir 0.1 mL de una solución de ácido tricloroacético al 72 % (p/v) y mezclar usando el vórtex. Centrifugar a 3 000 g durante 30 min, decantar el líquido y eliminar el líquido residual con una pipeta. Redisolver la proteína en 1 mL de reactivo de cobre alcalino.</p>		
MÉTODO B		
<p>Solución de prueba. Use un matraz volumétrico con un volumen adecuado para la preparación de una solución que contenga alrededor de 5 mg por mililitro de polisacárido seco. Transferir cuantitativamente el contenido de un recipiente al matraz y diluir a volumen con agua. Colocar 1 mL de la solución en un tubo de vidrio y agregar 0.15 mL de una solución de 400 g/L de ácido tricloroacético. Agitar, dejar reposar 15 min, centrifugar 10 min a 5 000 RPM y desechar el sobrenadante. Agregue 0.4 mL de hidróxido de sodio 0.1 M al sedimento.</p> <p>Soluciones de referencia. Disolver 0.1 g de albúmina bovina en 100 mL de hidróxido de sodio 0.1 M (solución madre que contiene 1 g de proteína por litro). Diluir 1 mL de la solución madre a 20 mL con hidróxido de sodio 0.1 M (dilución de trabajo 1: 50 mg de proteína por litro). Diluir 1 mL de la solución madre a 4 mL con hidróxido de sodio</p>		

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>0.1 M (dilución de trabajo 2: 250 mg de proteína por litro). Colocar en 6 tubos de vidrio 0.10 mL, 0.20 mL y 0.40 mL de la dilución de trabajo 1 y 0.15 mL, 0.20 mL y 0.25 mL de la dilución de trabajo 2. Completar el volumen de cada tubo a 0.40 mL usando hidróxido de sodio 0.1 M.</p> <p>Blanco. Prepare un blanco con 0.40 mL de hidróxido de sodio 0.1 M.</p> <p>Reactivo de Cupri-tartárica. Prepare una solución que contenga 1.0 % (m/v) de y 2.0 % (m/v) de tartrato de sodio.</p> <p>A 1.0 mL de la solución anterior agregar 50 mL de SR de carbonato de sodio. Preparar inmediatamente antes de usar.</p> <p>Reactivo de carbonato de sodio. Solución al 10.6 % (m/v) de carbonato de sodio anhidro.</p> <p>Reactivo Fosfomolibdotúngstico. Solución de molibdotungstofosfato de sodio y litio. (Folin Ciocalteau fenol reactivo comercial).</p> <p>Procedimiento. Agregar 2 mL de reactivo de cupri-tartárica a cada tubo, agitar y dejar reposar por 10 min. Agregar a cada tubo 0.2 mL de una mezcla de volúmenes iguales de reactivo fosfomolibdotúngstico y agua, preparada inmediatamente antes de su uso. Tapar los tubos, mezclar por inversión y dejar reposar en la oscuridad durante 30 min. El color azul es estable durante 60 min. Si es necesario, centrifugar para obtener soluciones claras.</p> <p>Mida la absorbancia de cada solución a 760 nm utilizando el blanco como líquido de compensación.</p>		

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>Construya una curva de calibración de las absorbancias de las 6 soluciones de referencia contra los contenidos de proteína correspondientes y calcule el contenido de proteína en la solución de prueba.</p>		
<p>MÉTODO DE BRADFORD</p> <p>Este método se basa en el cambio de absorción de 470 a 595 nm que se observa cuando el colorante ácido azul 90 se une a la proteína. El colorante ácido azul 90 se une más rápidamente a los residuos de arginina y lisina en la proteína, lo cual puede conducir a una variación en la respuesta del ensayo entre diferentes proteínas. Hay relativamente pocas sustancias interferentes, pero es preferible evitar detergentes y anfolitos en la muestra a evaluar. Las sustancias altamente alcalinas pueden interferir con la acidez del reactivo.</p> <p>Solución de prueba. Disolver una cantidad suficiente de la sustancia por analizar en la solución amortiguadora, seleccionada para obtener una solución que tenga una concentración dentro del intervalo de la curva de referencia.</p> <p>Soluciones de referencia. Disolver la sustancia de referencia para la proteína a determinar en la solución amortiguadora seleccionada. Diluir porciones de esta solución con el mismo amortiguador, para obtener no menos de cinco soluciones de referencia, que contengan concentraciones de proteína uniformemente</p>		

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

Dice	Debe decir	Justificación*
separadas entre sí dentro del intervalo situado entre 0.1 y 1 mg/mL.		
<p>Blanco. Usar la solución amortiguadora empleada, para preparar la solución de prueba y las soluciones de referencia.</p> <p>Reactivo azul ácido 90. Disolver 0.10 g de azul ácido en 50 mL de alcohol. Adicionar 100 mL de ácido ortofosfórico, llevar a 1 000 mL con agua destilada y mezclar. Filtrar la solución y almacenar en frasco ámbar a una temperatura entre 20 y 25 °C. Pequeños precipitados de colorante pueden aparecer durante el almacenamiento. Filtrar el reactivo previo uso.</p> <p>Procedimiento. Adicionar 5 mL del Reactivo azul ácido 90 a 0.100 mL de cada solución de referencia, a la solución de prueba y al blanco. Mezclar por inversión. Evitar la formación de espuma para impedir una baja reproducibilidad. Determinar las absorbancias de las soluciones estándar y de la solución de prueba a 595 nm, usando el blanco para el ajuste a cero (<i>MGA 0361, Espectrofotometría visible y ultravioleta</i>).</p>		
<p>Nota: no usar celdas de cuarzo para las lecturas porque el colorante puede adherirse al material.</p> <p>Cálculos. La relación entre absorbancia y concentración de proteínas no es lineal; sin embargo, si el intervalo de concentraciones usado para preparar la curva de referencia es suficientemente pequeño, la parte final se aproximará a la linealidad. Graficar las absorbancias de las soluciones de referencia</p>		

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>contra las concentraciones de proteínas y usar regresión lineal para establecer la curva de referencia. A partir de esta y de la absorbancia de la solución de prueba, determinar la concentración de proteína en la solución de prueba, multiplicando por el factor de dilución de la muestra.</p>		
MÉTODO DEL ÁCIDO BICINCONÍNICO (ABC)		
<p>Este método está basado en la reducción del ión cúprico (Cu^{2+}) a ión cuproso (Cu^{1+}) por la proteína. El reactivo del ácido bicinconínico se usa para detectar el ión cuproso. Pocas sustancias interfieren con la reacción. Cuando hay la presencia de sustancias interferentes, su efecto puede ser disminuido por dilución, estableciendo la concentración de la proteína de prueba de manera que quede una cantidad suficiente para una determinación exacta, el método para precipitación de proteínas que se señala en el Método de Lowry puede usarse para eliminar sustancias interferentes.</p>		
<p>Solución de prueba. Disolver una cantidad suficiente de la sustancia a examinar en la solución amortiguadora seleccionada para obtener una solución que contenga una concentración dentro del intervalo de concentraciones de las soluciones de referencia.</p> <p>Soluciones de referencia. Disolver la sustancia de referencia para la proteína a determinar en la solución amortiguadora seleccionada. Diluir porciones de esta solución con el mismo regulador para obtener no menos de cinco soluciones de</p>		

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

Dice	Debe decir	Justificación*
referencia con concentraciones de proteína igualmente separadas unas de otras dentro de un intervalo situado entre 10 y 1 200 µg/mL.		
<p>Blanco. Usar la solución amortiguadora empleada para preparar las soluciones de prueba y las soluciones de referencia.</p> <p>Reactivo ABC. Disolver 10 g de bicinconinato disódico, 20 g de carbonato de sodio monohidratado, 1.6 g de tartrato de sodio, 4 g de hidróxido de sodio y 9.5 g de bicarbonato de sodio en agua destilada. Ajustar el pH a 11.25 si es necesario con una solución de hidróxido de sodio o una solución de bicarbonato de sodio. Diluir a 1 000 mL con agua destilada y mezclar.</p>		
<p>Reactivo de ABC-Cobre. Mezclar 1 mL de una solución de sulfato de cobre al 4 % (p/v) y 50 mL del Reactivo ABC.</p> <p>Procedimiento. Mezclar 0.1 mL de cada una de las soluciones de referencia, de la solución de prueba y del blanco con 2 mL del Reactivo de ABC-Cobre. Incubar las soluciones a 37 °C durante 30 min, registrar el tiempo y dejar que las soluciones se enfríen a una temperatura entre 20 y 25 °C. Determinar las absorbancias de las soluciones de referencia y de la solución de prueba dentro de los 60 min posteriores al final de la incubación a una longitud de onda de 562 nm en celdas de cuarzo usando el blanco para el ajuste a cero (MGA 0361, Espectrofotometría visible y ultravioleta). Después de que las soluciones alcanzan la temperatura entre 20 y 25 °C, la</p>		

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

Dice	Debe decir	Justificación*
intensidad de color continúa incrementándose gradualmente.		
<p>Cálculos. La relación entre absorbancia y concentración de proteína no es lineal; sin embargo, si el intervalo de concentraciones usado para preparar la curva de referencia es suficientemente pequeño, la parte final se aproximará a la linealidad. Graficar las absorbancias de las soluciones de referencia contra las concentraciones de proteína y usar regresión lineal para establecer la curva de referencia. A partir de ésta y de la absorbancia de la solución de prueba, determinar la concentración de proteína en la solución de prueba, multiplicando por el factor de dilución de la muestra.</p>		
MÉTODO DE BIURET		
<p>Este método se basa en la interacción del ión cúprico (Cu^{2+}) con la proteína en solución alcalina y el resultante desarrollo de absorbancia a 545 nm. Esta prueba muestra una diferencia mínima entre muestras equivalentes de IgG y albúmina. La adición de hidróxido de sodio y el reactivo de Biuret como un reactivo combinado, un mezclado insuficiente posterior a la adición de hidróxido de sodio, o un tiempo prolongado entre la adición del hidróxido de sodio y la adición del reactivo de Biuret dará una mayor respuesta en muestras de IgG que en muestras de albúmina. El método del ácido tricloroacético usado para minimizar el efecto de sustancias interferentes, también puede ser usado para determinar el contenido de proteína en</p>		

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

Dice	Debe decir	Justificación*
muestras con concentraciones por debajo de 500 µg/mL.		
<p>Solución de prueba. Disolver una cantidad suficiente de la muestra a analizar en una solución de cloruro de sodio al 0.9 % (p/v) para obtener una solución que tenga una concentración dentro del intervalo de concentraciones de las soluciones de referencia.</p> <p>Soluciones de referencia. Disolver la sustancia de referencia para la proteína a determinar en una solución de cloruro de sodio al 0.9 % (p/v). Diluir porciones de esta solución con el mismo diluyente para obtener no menos de tres soluciones de referencia que tengan concentraciones uniformemente separadas entre sí en un intervalo adecuado entre 0.5 y 10 mg/mL.</p>		
<p>Blanco. Usar una solución de cloruro de sodio al 0.9 % (m/v).</p> <p>Reactivo de Biuret. Disolver 3.46 g de sulfato de cobre en 10 mL de agua destilada caliente, y dejar enfriar (solución A). Disolver 34.6 g de citrato de sodio y 20.0 g de carbonato de sodio anhidro en 80 mL de agua destilada caliente y dejar enfriar (solución B). Mezclar las soluciones A y B y llevar a 200 mL con agua destilada. Usar dentro de los 6 meses siguientes. No usar el reactivo si éste desarrolla turbiedad o contiene cualquier precipitado.</p>		
<p>Procedimiento. A un volumen de la solución de prueba adicionar un volumen igual de una solución de hidróxido de sodio al 6.0 % (p/v) y mezclar.</p>		

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>Inmediatamente adicionar Reactivo de Biuret equivalente a 0.4 volúmenes de la solución de prueba y mezclar rápidamente. Dejar reposar a una temperatura entre 15 y 25 °C durante no menos de 15 min. Determinar las absorbancias de las soluciones de referencia y la solución de prueba a un máximo de 545 nm, dentro de los 90 min posteriores a la adición del reactivo de Biuret usando el blanco para el ajuste a cero (MGA 0361, Espectrofotometría visible y ultravioleta). Cualquier solución que desarrolle turbiedad o que precipite no es aceptable para el cálculo de la concentración de proteína.</p>		
<p>Cálculos. La relación entre absorbancia y concentración de proteína es aproximadamente lineal dentro del intervalo de las concentraciones de proteína de las soluciones de referencia. Graficar las absorbancias de las soluciones de referencia contra las concentraciones de proteína y usar regresión lineal para establecer la curva de referencia. Calcular el coeficiente de correlación de la curva de referencia. Un sistema satisfactorio es aquel que proporciona una línea con un coeficiente de correlación de no menos de 0.99. A partir de la curva de referencia y la absorbancia de la solución de prueba, determinar la concentración de proteína en la solución de prueba, multiplicando por el factor de dilución de la muestra.</p>		
<p>Sustancias interferentes. Para minimizar el efecto de sustancias interferentes, la proteína puede precipitarse a partir de la muestra de prueba como</p>		

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>sigue: añadir 0.1 volúmenes de una solución de ácido tricloroacético al 50 % (p/v) a un volumen de la solución de prueba, retirar la capa sobrenadante y disolver el precipitado en un volumen pequeño de hidróxido de sodio 0.5 M. Usar la solución obtenida para preparar la solución de prueba.</p>		
MÉTODO FLUOROMÉTRICO		
<p>Este método se basa en la derivación de la proteína con o-ftalaldehído, el cual reacciona con las aminas primarias de la proteína (aminoácido N-terminal y en la posición E del aminoácido lisina). La sensibilidad de la prueba puede incrementarse hidrolizando la proteína antes de la adición del o-ftalaldehído. La hidrólisis hace que los grupos α-amino de los aminoácidos constituyentes estén disponibles para la reacción con el o-ftalaldehído. El método requiere muy pequeñas cantidades de proteína. Aminas primarias tales como tris (hidroximetil) amino metano y reguladores de aminoácidos reaccionan con el ftalaldehído y deben evitarse o eliminarse. El amonio a altas concentraciones reacciona con el ftalaldehído. La fluorescencia obtenida cuando la amina reacciona con el ftalaldehído puede ser inestable. El uso de procedimientos automatizados para estandarizar este método podría mejorar la exactitud y precisión de la prueba.</p>		
<p>Solución de prueba. Disolver una cantidad de la sustancia a evaluar en una solución de cloruro de sodio al 0.9 % (p/v) para obtener una solución cuya concentración esté dentro del intervalo de</p>		

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>concentraciones de la solución de referencia. Ajustar la solución a un pH entre 8 y 10.5 antes de la adición del <i>o</i>-ftalaldehído.</p> <p>Soluciones de referencia. Disolver las sustancia de referencia para la proteína a determinar en una solución de cloruro de sodio al 0.9 % (p/v). Diluir porciones de ésta con el mismo diluyente para obtener no menos de cinco soluciones de referencia a concentraciones uniformemente separadas en un intervalo adecuado entre 10 y 200 µg/mL. Ajustar las soluciones a un pH entre 8 y 10.5; antes de la adición del ftalaldehído.</p> <p>Blanco. Usar una solución de cloruro de sodio al 0.9 % (p/v).</p>		
<p>Solución amortiguadora de borato. Disolver 61.83 g de ácido bórico en agua destilada y ajustar a pH de 10.4 con una solución de hidróxido de potasio. Llevar a 1 000 mL con agua destilada y mezclar.</p> <p>Solución base de ftalaldehído. Disolver 1.20 g de ftalaldehído en 1.5 mL de metanol, adicionar 100 mL de solución amortiguadora de borato y mezclar. Añadir 0.6 mL de una solución de éter lauril 23 macrogol al 30.0 % (p/v) y mezclar. Almacenar a una temperatura entre 20 y 25 °C y usar dentro de las 3 semanas posteriores.</p> <p>Reactivo de ftalaldehído. A 5 mL de la solución base de ftalaldehído añadir 15 µl de 2-mercaptoetanol. Preparar al menos 30 min antes de usarse. Usar dentro un lapso de 24 h.</p>		

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>Procedimiento. Mezclar 10 µL de la solución de prueba y de cada una de las soluciones de referencia con 0.1 mL de reactivo de ftalaldehído y dejar reposar a una temperatura entre 20 y 25 °C durante 15 min. Añadir 3 mL de hidróxido de sodio 0.5 M y mezclar. Determinar la intensidad de fluorescencia (<i>MGA 0341, Espectrofotometría de fluorescencia</i>), de las soluciones de referencia y de la solución de prueba a una longitud de onda de excitación de 340 nm y a una longitud de onda de emisión entre 440 y 455 nm. Medir la intensidad de fluorescencia de una muestra dada solo una vez, ya que la irradiación disminuye la intensidad de fluorescencia.</p>		
<p>Cálculos. La relación entre la fluorescencia y la concentración de proteína es lineal. Graficar las intensidades de fluorescencia de las soluciones de referencia contra las concentraciones de proteína y mediante regresión lineal establecer la curva de referencia. Con la curva de referencia y la intensidad de la fluorescencia de la solución de prueba, determinar la concentración de proteína en la solución de prueba, multiplicando por el factor de dilución de la muestra.</p>		
<p>MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO</p>		
<p>Estos métodos se basan en el análisis de nitrógeno como una medida de la determinación de proteína. La determinación de proteínas por éstos métodos puede verse afectada por la presencia de otras sustancias que contengan nitrógeno en la muestra</p>		

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

Dice	Debe decir	Justificación*
de prueba. Los métodos para el análisis de nitrógeno destruyen la muestra en el análisis.		
A. MÉTODO DE KJELDAHL. Proceder como se indica en el <i>MPB 0840, Determinación de proteínas por Kjeldahl.</i>		
B. MÉTODO DE QUIMIOLUMINISCENCIA O CONDUCTIVIDAD.		
Existen instrumentos para análisis de nitrógeno que usan la pirólisis (por ejemplo, combustión de la muestra en oxígeno a temperaturas cercanas a 1 000 °C), lo que produce óxido nítrico (NO) y otros óxidos de nitrógeno (NO _x) a partir del nitrógeno presente en la sustancia de prueba. Algunos instrumentos convierten el óxido nítrico en nitrógeno gaseoso, el cual se cuantifica usando un detector de conductividad térmica. Otros instrumentos mezclan el óxido nítrico (NO) con ozono (O ₃) para producir dióxido de nitrógeno excitado (NO ₂ [*]) que emite luz cuando regresa a su estado basal y puede ser cuantificado con un detector de quimioluminiscencia. Una proteína de referencia que está relativamente pura y es similar en composición a las proteínas de prueba, es usada para optimizar los parámetros de inyección y pirólisis y para evaluar la consistencia en el análisis.		
Cálculos. La concentración de proteína es calculada dividiendo el contenido de nitrógeno de la muestra entre el contenido conocido de nitrógeno de la proteína. El contenido de nitrógeno conocido de la proteína puede determinarse a		

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

Dice	Debe decir	Justificación*
partir de la composición química de la proteína o por comparación con la sustancia de referencia apropiada.		

*Para una mejor comprensión de su solicitud adjunte bibliografía u otros documentos que sustenten sus comentarios.

CONSULTA