



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

**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 mayo hasta el 30 de junio de 2026, lo analicen, evalúen y envíen sus observaciones o comentarios en idioma español y con el sustento técnico suficiente ante la CPFEUM, sita en Río Rhin número 57, colonia Cuauhtémoc, código postal 06500, Ciudad de México, o al correo electrónico: [consultas@farmacopea.org.mx](mailto:consultas@farmacopea.org.mx).

**DATOS DEL PROMOVENTE**

Nombre: \_\_\_\_\_  
Institución o empresa: \_\_\_\_\_  
Teléfono: \_\_\_\_\_

Cargo: \_\_\_\_\_  
Dirección: \_\_\_\_\_  
Correo electrónico: \_\_\_\_\_

**NUEVA MONOGRAFÍA**

Dice	Debe decir	Justificación*
<b>MPB 0130. ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS</b>		
<b>INTRODUCCIÓN</b>		
El análisis de aminoácidos comprende el conjunto de metodologías empleadas para determinar la composición cualitativa y/o cuantitativa de aminoácidos en proteínas, péptidos y otras preparaciones farmacéuticas que los contengan en su formulación. Las proteínas y los péptidos son macromoléculas formadas por aminoácidos unidos covalentemente organizados como polímeros lineales. La secuencia de los aminoácidos en una proteína o un péptido determina las propiedades fisicoquímicas y biológicas de la molécula. Las proteínas se consideran moléculas grandes que existen comúnmente como estructuras plegadas con una conformación específica, mientras que los péptidos son más pequeños y pueden estar formados por pocos aminoácidos. El análisis de aminoácidos se puede usar para cuantificar		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>proteínas y péptidos, para determinar la identidad de proteínas o péptidos basándose en su composición de aminoácidos, para respaldar el análisis estructural de proteínas y péptidos, para evaluar estrategias de fragmentación para el mapeo de péptidos y para detectar aminoácidos atípicos presentes en una proteína o un péptido. Previo al análisis, las proteínas o péptidos deben someterse a un proceso de hidrólisis para liberar sus aminoácidos constituyentes. Una vez completada la hidrólisis, el procedimiento analítico puede realizarse de forma análoga al utilizado para aminoácidos libres en otras preparaciones farmacéuticas. Habitualmente, los aminoácidos presentes en la muestra se derivatizan con el fin de facilitar su separación, detección y cuantificación mediante las técnicas analíticas correspondientes.</p>		
<p><b>APARATOS</b></p>		
<p>Los métodos usados para el análisis de aminoácidos se basan, en general, en la separación cromatográfica de los aminoácidos presentes en la muestra de prueba. Las técnicas actuales emplean sistemas cromatográficos automatizados diseñados específicamente para estas metodologías analíticas. Un sistema típico de análisis de aminoácidos consiste en un cromatógrafo de líquidos de baja o alta presión, capaz de generar gradientes de fase móvil adecuados para la separación de los aminoácidos en una columna cromatográfica apropiada. El sistema deberá tener la capacidad de realizar la</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>derivatización de los aminoácidos posterior a la separación (derivatización postcolumna), salvo que el método emplee derivatización previa a la inyección (derivatización precolumna). El detector utilizado será, según el tipo de derivatización, de absorción en la región UV-visible o de fluorescencia, y deberá ser compatible con el método analítico seleccionado. El sistema deberá incluir un dispositivo de adquisición e integración de datos que permita registrar la señal del detector, procesarla y efectuar la cuantificación correspondiente. Se recomienda que los instrumentos destinados al análisis de aminoácidos se utilicen de manera exclusiva para este propósito, a fin de minimizar la contaminación cruzada y garantizar la reproducibilidad y confiabilidad de los resultados analíticos.</p>		
<p><b>PRECAUCIONES GENERALES</b></p>		
<p>La contaminación de fondo es siempre una preocupación en el análisis de aminoácidos. Se deberán emplear reactivos de alta pureza, ya que impurezas presentes en los reactivos pueden contribuir a señales aberrantes (p. ej., el ácido clorhídrico de baja pureza puede contribuir a la contaminación con glicina). Los reactivos deberán sustituirse periódicamente conforme a un programa establecido y se deberán utilizar únicamente disolventes grado cromatográfico (grado HPLC o equivalente). Para reducir la contaminación microbiana o por partículas extrañas, los disolventes deberán filtrarse previamente a su uso,</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>mantenerse en un recipiente debidamente cerrados y el equipo analítico deberá colocarse en un área protegido de la luz solar directa y de fuentes potenciales de contaminación.</p>		
<p>Las prácticas de laboratorio influyen significativamente en la calidad del análisis de aminoácidos. El instrumental deberá ubicarse en un área de bajo tránsito dentro del laboratorio y mantenerse en condiciones adecuadas de limpieza y orden. Las pipetas deberán limpiarse y calibrarse conforme a un programa de mantenimiento adecuado. Las puntas de pipeta deberán conservarse en contenedores cerrados y no manipularse directamente con las manos; se recomienda el uso de guantes sin polvo o equivalentes durante la manipulación de muestras y reactivos. Asimismo, se deberá limitar la apertura repetida de viales de muestra, ya que la exposición al ambiente puede introducir contaminantes, particularmente glicina, serina y alanina.</p>		
<p>Para garantizar resultados confiables, los instrumentos destinados al análisis de aminoácidos deberán mantenerse en condiciones óptimas de funcionamiento. Cuando el equipo se utilice de manera rutinaria, se deberán realizar verificaciones periódicas para detectar fugas, evaluar la estabilidad del detector y de la fuente de luz y confirmar la capacidad de la columna para mantener la resolución adecuada de los aminoácidos individuales. Los filtros y demás componentes sujetos a desgaste deberán limpiarse</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
o sustituirse conforme a un programa de mantenimiento preventivo documentado.		
<b>MATERIAL ESTÁNDAR DE REFERENCIA</b>		
Los estándares de aminoácidos aptos para este tipo de análisis están disponibles comercialmente y consisten generalmente en una mezcla acuosa de aminoácidos de concentración conocida. Estos estándares se emplean para la calibración del sistema, la verificación del desempeño del método y la cuantificación de los aminoácidos presentes en la muestra.		
Cuando se determina la composición de aminoácidos de proteínas o péptidos, es recomendable analizar, de manera paralela al material de prueba, un estándar de proteínas o péptidos como control del procedimiento completo, a fin de verificar la integridad de las etapas de hidrólisis, derivatización, separación y detección. Para este propósito, se ha usado ampliamente albúmina sérica bovina de alta pureza como estándar de proteína de referencia, sin perjuicio de que puedan emplearse otros materiales de referencia adecuados y trazables.		
<b>CALIBRACIÓN DE LOS INSTRUMENTOS</b>		
La calibración de los sistemas destinados al análisis de aminoácidos se realiza, en general, mediante el análisis de soluciones de estándares de aminoácidos de concentración conocida. Estas soluciones se emplean para establecer el factor de respuesta de cada aminoácido, así como el intervalo de trabajo y la linealidad del método		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>analítico. Para la calibración inicial, el analista prepara diluciones de estándar de aminoácidos que abarquen el intervalo de concentración esperado para la muestra y que se encuentren dentro del rango lineal del método. Posteriormente, se analizan las distintas concentraciones de cada aminoácido en condiciones reproducibles. Las respuestas analíticas (área bajo la curva, altura o factor respuesta) de los picos obtenidos para cada aminoácido se grafican en función de la concentración conocida para cada uno de los aminoácidos en la dilución estándar. Estos resultados permiten al analista determinar el intervalo de concentraciones de aminoácidos donde el área del pico de cada aminoácido es una función aproximadamente lineal de su concentración. Es importante que el analista prepare las muestras para el análisis de aminoácidos de manera que estén dentro de los límites analíticos (p. ej., intervalo de trabajo lineal) de la técnica empleada a fin de obtener resultados exactos y repetibles.</p>		
<p>Se analizan de cuatro a seis concentraciones del estándar de aminoácidos para determinar un factor de respuesta para cada aminoácido. El factor de respuesta se calcula como el área del pico o la altura del pico promedio por nmol de aminoácido presente en el estándar. Para calcular la concentración de cada aminoácido presente en la muestra de prueba se prepara y se usa un registro de calibración con el factor de respuesta de cada</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>aminoácido. En este cálculo se divide el área del pico de un aminoácido dado por su correspondiente factor de respuesta, y se obtienen así los nmol del aminoácido. Para los análisis de rutina, puede utilizarse una calibración de un solo punto, siempre que el sistema haya sido previamente calibrado en múltiples niveles y se verifique periódicamente mediante controles analíticos adecuados. El archivo de calibración deberá actualizarse conforme a un programa establecido y verificarse mediante el análisis de materiales de control, con el fin de asegurar la integridad y el desempeño continuo del sistema analítico.</p>		
<p><b>REPETIBILIDAD</b></p>		
<p>La obtención de resultados consistentes y de alta calidad en el análisis de aminoácidos requiere evaluar y controlar la repetibilidad del método analítico. Durante el análisis de la separación cromatográfica de los aminoácidos o los resultados de sus derivatizaciones, se pueden observar numerosos picos en el cromatograma que corresponden a los aminoácidos. El gran número de picos exige un sistema de análisis de aminoácidos que los pueda identificar repetidamente basándose en el tiempo de retención e integrar las respuestas analíticas (área bajo la curva, altura o factor respuesta) de los picos para la cuantificación. Una evaluación de repetibilidad típica involucra la preparación de una solución de aminoácidos estándar y el análisis de</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>varias determinaciones repetidas (es decir, seis análisis o más) de la misma solución estándar. Se determina la desviación estándar relativa (RSD, por sus siglas en inglés) para el tiempo de retención y el área del pico integrada de cada aminoácido. La evaluación de la repetibilidad se amplía incluyendo múltiples valoraciones realizadas durante varios días por distintos analistas, a fin de valorar la variabilidad intermedia del método. Las múltiples valoraciones incluyen la preparación de diluciones del estándar a partir de materiales iniciales para determinar la variación debida al procesamiento de la muestra. A menudo, la composición de aminoácidos de una proteína estándar (p. ej., albúmina de suero bovino) se analiza como parte de la evaluación de repetibilidad. La evaluación de la variación de determinaciones repetidas (es decir, la RSD) permite al laboratorio establecer límites analíticos para asegurar que sus análisis se encuentran bajo control. Es conveniente establecer los límites de variación mínimos practicables para asegurar los mejores resultados. Para disminuir la variabilidad del análisis de aminoácidos, conviene enfocarse en la preparación de la muestra, la elevada interferencia espectral de fondo debido a la calidad de los reactivos y/o a las prácticas del laboratorio, el funcionamiento y mantenimiento de los instrumentos, el análisis y la interpretación de los datos y el desempeño y los hábitos del analista.</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>Todos los parámetros se investigan a fondo como parte del trabajo de validación.</p>		
<p><b>PREPARACIÓN DE LA MUESTRA</b></p>		
<p>La obtención de resultados exactos del análisis de aminoácidos exige muestras purificadas de proteínas y péptidos. Los componentes de las soluciones amortiguadoras (ej., sales, urea, detergentes) pueden interferir con el análisis de aminoácidos y se deberán eliminar de la muestra antes del análisis. En general, los métodos que emplean derivatización postcolumna presentan menor susceptibilidad a estas interferencias que los métodos de derivatización precolumna; no obstante, la eliminación de componentes interferentes es recomendable en ambos casos. Se deberá limitar al mínimo el número de manipulaciones de la muestra a fin de reducir la contaminación de fondo, mejorar la recuperación de los analitos y optimizar la reproducibilidad del método. Las técnicas comunes empleadas para eliminar los componentes de las soluciones amortiguadoras de las muestras de proteínas incluyen:</p>		
<p>(1) inyectar la muestra de proteína en un sistema HPLC en fase reversa, extrayendo la proteína con un disolvente volátil que contenga suficiente componente orgánico y secando la muestra en una centrifuga de vacío;</p>		
<p>(2) diálisis contra una solución amortiguadora volátil o agua;</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
(3) ultrafiltración centrífuga para el reemplazo de la solución amortiguadora por una solución amortiguadora volátil o agua;		
(4) precipitar la proteína de la solución amortiguadora usando un disolvente orgánico (ej.: acetona); y		
(5) filtración en gel.		
El método seleccionado deberá ser compatible con el tipo de muestra, la sensibilidad requerida y las características del análisis posterior.		
<b>ESTÁNDARES INTERNOS</b>		
Se recomienda usar un estándar interno para controlar las pérdidas y variaciones físicas y químicas durante el análisis de aminoácidos. Antes de la hidrólisis, se puede agregar a la solución de proteína una cantidad de estándar interno conocida con exactitud. La recuperación del estándar interno indica la recuperación general de los aminoácidos de la solución de proteína. Sin embargo, los aminoácidos libres no se comportan igual que los aminoácidos unidos a proteínas durante la hidrólisis, ya que sus velocidades de liberación o destrucción son variables. Por lo tanto, el uso de un estándar interno para corregir las pérdidas durante la hidrólisis puede proporcionar resultados no confiables. Hay que tener en cuenta este punto cuando se interpretan los resultados. También se pueden agregar estándares internos a la mezcla de aminoácidos después de la hidrólisis para corregir por las diferencias en la aplicación de las muestras y los cambios en la estabilidad del reactivo y las		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>velocidades de flujo. Idealmente, un estándar interno es un aminoácido primario que no se encuentra naturalmente y que está disponible comercialmente a bajo precio. También debe ser estable durante la hidrólisis, su factor de respuesta debe ser función lineal de su concentración y debe eluir con un tiempo de retención único, sin superponerse con otros aminoácidos. Los estándares de aminoácidos comúnmente empleados incluyen la norleucina, la nitrotirosina y el ácido <math>\alpha</math>-aminobutírico, sin perjuicio de que puedan emplearse otros compuestos adecuados y validados para el método analítico específico</p>		
<b>HIDRÓLISIS DE PROTEÍNAS</b>		
<p>La hidrólisis de muestras de proteínas y péptidos es necesaria para el análisis de aminoácidos de estas moléculas. El material de vidrio usado para la hidrólisis debe estar muy limpio para evitar resultados erróneos. Los polvos para guantes y las huellas dactilares en los tubos de hidrólisis pueden causar contaminación. Para limpiar los tubos de vidrio para hidrólisis, hay que hervir los tubos durante 1 hora en ácido clorhídrico 1 M o sumergirlos en ácido nítrico concentrado o en una mezcla de ácido clorhídrico concentrado y ácido nítrico concentrado (1:1). Los tubos de hidrólisis limpios se enjuagan con agua de alta pureza, seguido por un enjuague con metanol de grado HPLC, se secan durante toda la noche en un horno y se almacenan cubiertos hasta su uso. Alternativamente, el material de vidrio limpio se</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>puede someter a pirólisis a 500 °C durante 4 horas para eliminar la contaminación de los tubos para hidrólisis. También se puede usar material de laboratorio desechable adecuado para este fin.</p>		
<p>La hidrólisis ácida es el método más común para hidrolizar una muestra de proteína o péptido antes del análisis de aminoácidos. La técnica de hidrólisis ácida puede aumentar la variabilidad del análisis debido a la destrucción completa o parcial de varios aminoácidos. El triptófano se destruye; la serina y la treonina se destruyen parcialmente; la metionina puede oxidarse; y la cisteína típicamente se recupera como cistina (pero la recuperación de la cistina suele ser mala debido a la destrucción o reducción parcial a cisteína). La aplicación de vacío adecuado (menos de 200 µm de mercurio o 26.7 Pa) o la introducción de un gas inerte (argón) en el <i>headspace</i> (la cámara gaseosa superior del recipiente de reacción) puede reducir la destrucción oxidativa. En las uniones peptídicas que involucran isoleucina y valina, las uniones amida de Ile-Ile, Val-Val, Ile-Val y Val-Ile se escinden parcialmente; y la asparagina y la glutamina se desamidán, dando como resultado ácido aspártico y ácido glutámico, respectivamente. La pérdida de triptófano, asparagina y glutamina durante una hidrólisis ácida limita la cuantificación a 17 aminoácidos. Algunas de las técnicas de hidrólisis descritas se usan para tratar estos problemas. Algunas de las técnicas de hidrólisis descritas (es decir, los <i>Métodos 4-11</i>)</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>pueden modificar otros aminoácidos. Por lo tanto, hay que considerar las ventajas de usar una técnica de hidrólisis en comparación con sus problemas; estas ventajas se analizan adecuadamente antes de emplear un método que no sea la hidrólisis ácida.</p>		
<p>A menudo se emplea un estudio en función del tiempo (es decir, un análisis de aminoácidos con tiempos de hidrólisis ácida de 24, 48 y 72 horas) para analizar la concentración inicial de aminoácidos que se destruyen parcialmente o que se escinden lentamente. Al graficar la concentración observada de aminoácidos lábiles (es decir, serina y treonina) en función del tiempo de hidrólisis, se puede extrapolar la línea hasta su origen para determinar la concentración inicial de estos aminoácidos. Los estudios de hidrólisis en función del tiempo también se usan con aminoácidos que se escinden lentamente (ej., isoleucina y valina). Durante el transcurso del tiempo de hidrólisis, el analista observa una meseta en estos residuos. El nivel de esta meseta se considera la concentración de residuo. Si el tiempo de hidrólisis es demasiado largo, la concentración del residuo en la muestra comienza a disminuir, indicando una destrucción por las condiciones de hidrólisis.</p>		
<p>Una alternativa aceptable al estudio en función del tiempo es someter un estándar de calibración de un aminoácido a las mismas condiciones de hidrólisis que la muestra de prueba. El aminoácido</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>libre puede no ser totalmente representativo de la velocidad de destrucción de los aminoácidos lábiles dentro de un péptido o una proteína durante la hidrólisis. Esto es especialmente válido para las uniones peptídicas que se escinden lentamente (ej., uniones Ile-Val). Sin embargo, esta técnica permite al analista dar cuenta de cierta destrucción de residuos. Se ha empleado la hidrólisis ácida por microondas y ésta es rápida, pero exige equipo y precauciones especiales. Las condiciones óptimas para la hidrólisis por microondas se deben investigar para cada muestra de proteína o péptido. La técnica de hidrólisis por microondas típicamente toma solo unos minutos, pero una variación de 1 minuto puede proporcionar resultados inadecuados (ej., hidrólisis incompleta o destrucción de aminoácidos lábiles). Se ha empleado la proteólisis completa usando una mezcla de proteasas pero puede ser complicada, exige controles adecuados y, por lo general, se puede aplicar más a péptidos que a proteínas.</p>		
<p><i>Nota:</i> Durante el análisis inicial de una proteína desconocida, se deben realizar experimentos con diferentes tiempos de hidrólisis y condiciones de temperatura para determinar las condiciones óptimas.</p>		
<p><b>Método 1</b></p>		
<p>La hidrólisis ácida usando ácido clorhídrico que contenga fenol es el procedimiento más comúnmente usado para la hidrólisis de proteínas o péptidos antes del análisis de aminoácidos. La</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
adición de fenol a la reacción evita la halogenación de la tirosina.		
Solución de Hidrólisis: ácido clorhídrico 6 N que contenga entre 0.1 % y 1.0 % de fenol.		
<p><b>Procedimiento:</b></p> <p><b>Hidrólisis en fase líquida:</b> Colocar la muestra de proteína o péptido en un tubo para hidrólisis y secar. [Nota: La muestra se seca para que el agua de la muestra no diluya el ácido empleado para la hidrólisis.] Agregar 200 µL de la <i>solución de hidrólisis</i> por cada 500 µg de proteína liofilizada. Congelar el tubo de la muestra en un baño de hielo seco y acetona y sellar a la llama en vacío. Las muestras típicamente se hidrolizan a 110 °C durante 24 horas al vacío o en una atmósfera inerte para evitar la oxidación. Se investigan tiempos mayores de hidrólisis (ej., 48 y 72 horas) si existe la preocupación de que la proteína no esté totalmente hidrolizada.</p>		
<p><b>Hidrólisis en fase de vapor:</b> Éste es uno de los procedimientos de hidrólisis ácida más comunes y se prefiere para el microanálisis cuando solo se dispone de pequeñas cantidades de muestra. La contaminación de la muestra por el reactivo ácido también se minimiza usando la hidrólisis en fase de vapor. Colocar los viales que contengan las muestras secas en un recipiente con una cantidad adecuada de la <i>solución de hidrólisis</i>. La <i>solución de hidrólisis</i> no entra en contacto con la muestra de prueba. Aplicar una atmósfera inerte o vacío (menos de 200 µm de mercurio o 26.7 Pa) al</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p><i>headspace</i> y calentar aproximadamente a 110 °C durante un tiempo de hidrólisis de 24 horas. El vapor ácido hidroliza la muestra seca. Minimizar toda condensación del ácido en los viales de la muestra. Después de la hidrólisis, secar la muestra al vacío para eliminar el ácido residual.</p>		
<p><b>Método 2</b></p>		
<p>La oxidación del triptófano durante la hidrólisis disminuye si se usa ácido mercaptoetanosulfónico (MESA) como ácido reductor.</p>		
<p>Solución de hidrólisis: solución de ácido mercaptoetanosulfónico (MESA) 2.5 M.</p>		
<p><b>Hidrólisis en fase de vapor:</b> Secar aproximadamente de 1 a 100 µg de la proteína o péptido en análisis en un tubo de hidrólisis. Colocar el tubo de hidrólisis en un tubo más grande con aproximadamente 200 µL de la <i>solución de hidrólisis</i>. Sellar al vacío el tubo más grande (aproximadamente a 50 µm de mercurio o 6.7 Pa) para vaporizar la <i>solución de hidrólisis</i>. Calentar el tubo de hidrólisis entre 170 y 185 °C durante aproximadamente 12.5 minutos. Después de la hidrólisis, secar el tubo de hidrólisis al vacío durante 15 minutos para eliminar el ácido residual.</p>		
<p><b>Método 3</b></p>		
<p>La oxidación del triptófano durante la hidrólisis se evita usando ácido tioglicólico (TGA) como ácido reductor.</p>		
<p>Solución de hidrólisis: una solución que contenga ácido clorhídrico 7 M, 10 % de ácido</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
trifluoroacético, 20 % de ácido tioglicólico y 1 % de fenol.		
<p><b>Hidrólisis en fase de vapor:</b> Secar aproximadamente de 10 µg a 50 µg de la proteína o péptido en análisis en un tubo de hidrólisis. Colocar el tubo de hidrólisis en un tubo más grande con aproximadamente 200 µL de la <i>solución de hidrólisis</i>. Sellar el tubo más grande al vacío (aproximadamente a 50 µm de mercurio o 6.7 Pa) para vaporizar el TGA. Calentar el tubo de muestra a 166 °C durante aproximadamente 15 a 30 minutos. Después de la hidrólisis, secar el tubo de muestra al vacío durante 5 minutos para eliminar el ácido residual. La recuperación de triptófano por este método puede depender de la cantidad de muestra presente.</p>		
<p><b>Método 4</b></p>		
<p>La oxidación de la cisteína-cistina y de la metionina se realiza con ácido perfórmico antes de la hidrólisis de la proteína o péptido.</p>		
<p>Solución de oxidación: Preparar ácido perfórmico en el momento de análisis mezclando ácido fórmico y peróxido de hidrógeno al 30 % (9:1) e incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.</p>		
<p><b>Procedimiento:</b> Disolver la muestra de proteína o péptido en 20 µL de ácido fórmico y calentar a 50 °C durante 5 minutos; y después, agregar 100 µL de la <i>solución de oxidación</i>. Dejar que la oxidación continúe durante 10 a 30 minutos. En esta reacción, la cisteína se convierte en ácido cisteico y la metionina se convierte en metionina sulfona.</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
Eliminar el reactivo en exceso de la muestra en una centrífuga de vacío. Esta técnica puede modificar los residuos de tirosina en presencia de haluros. Luego se puede realizar una hidrólisis ácida de la proteína oxidada usando el <i>Método 1</i> o el <i>Método 2</i> .		
<b>Método 5</b>		
La oxidación de cisteína-cistina se logra durante la hidrólisis en fase líquida con azida de sodio.		
Solución de hidrólisis: solución de ácido clorhídrico 6 M que contenga 0.2 % de fenol, agregar azida de sodio para obtener una concentración final de 0.2 % (p/v). El fenol agregado evita la halogenación de la tirosina.		
<b>Hidrólisis en fase líquida:</b> Realizar la hidrólisis de la proteína o péptido aproximadamente a 110 °C durante 24 horas. Durante la hidrólisis, la cisteína-cistina presente en la muestra se convierte en ácido cisteico mediante la azida de sodio presente en la <i>solución de hidrólisis</i> . Esta técnica permite una mejor recuperación de tirosina que el <i>Método 4</i> , pero no es cuantitativa para la metionina. La metionina se convierte en una mezcla de la metionina original y sus dos productos de oxidación, metionina sulfóxido y metionina sulfona.		
<b>Método 6</b>		
La oxidación de cisteína-cistina se logra con dimetil sulfóxido (DMSO).		
Solución de hidrólisis: a una solución de ácido clorhídrico 6 M que contenga de 0.1 a 1.0 % de		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
fenol, agregar DMSO para obtener una concentración final de 2 % (v/v).		
<p><b>Hidrólisis en fase de vapor:</b> Realizar la hidrólisis de la proteína o péptido aproximadamente a 110 °C durante 24 horas. Durante la hidrólisis, la cisteína-cistina presente en la muestra se convierte en ácido cisteico por el DMSO presente en la <i>solución de hidrólisis</i>. Para reducir la variabilidad y compensar la destrucción parcial, se recomienda evaluar la recuperación de ácido cisteico de la hidrólisis oxidativa de un estándar de proteína que contengan de 1 a 8 moles de cisteína por mol de proteína. Los factores de respuesta de proteínas o péptidos hidrolizados por lo general son aproximadamente 30 % menores que los de los estándares de ácido cisteico no hidrolizados. Como la histidina, la metionina, la tirosina y el triptófano también se modifican, con esta técnica no se obtiene un análisis completo de la composición.</p>		
<b>Método 7</b>		
La reducción y la alquilación de cisteína-cistina se logra a través de una reacción de piridiletilación en fase de vapor.		
Solución reductora: Transferir 83.3 µL de piridina, 16.7 µL de 4-vinilpiridina, 16.7 µL de tributilfosfina y 83.3 µL de agua a un recipiente adecuado y mezclar.		
<b>Procedimiento:</b> Agregar la proteína o péptido (entre 1 y 100 µg) a un tubo de hidrólisis y colocar en un tubo más grande. Transferir la <i>solución reductora</i> al tubo más grande, sellar al vacío		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>(aproximadamente a 50 µm de mercurio o 6.7 Pa), e incubar aproximadamente a 100 °C durante 5 minutos. Luego, retirar el tubo de hidrólisis interior y secarlo en un desecador de vacío durante 15 minutos para eliminar los reactivos residuales. Después, se puede realizar una hidrólisis ácida de la proteína o péptido piridiletilados usando los procedimientos descritos previamente. La reacción de piridiletilación se realiza simultáneamente con una muestra de un estándar de proteína que contenga de 1 a 8 moles de cisteína por mol de proteína, para mejorar la exactitud de la recuperación de piridiletil-cisteína. Mayores tiempos en la reacción de piridiletilación pueden modificar el grupo α-amino terminal y el grupo ε-amino de la lisina en la proteína.</p>		
<p><b>Método 8</b></p>		
<p>La reducción de cisteína-cistina y la alquilación se logran a través de una reacción de piridiletilación en fase líquida.</p>		
<p>Soluciones madre: Preparar y filtrar tres soluciones: clorhidrato de Tris 1 M (pH 8.5) que contenga edetato disódico 4 mM (<i>Solución madre 1</i>), clorhidrato de guanidina 8 M (<i>Solución madre 2</i>) y 2-mercaptoetanol al 10 % en agua (<i>Solución madre 3</i>).</p>		
<p>Solución reductora: Preparar una mezcla de la <i>solución madre 2</i> y la <i>solución madre 1</i> (3:1) para obtener una solución amortiguada de clorhidrato de guanidina 6 M en clorhidrato de Tris 0.25 M.</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p><b>Procedimiento:</b> Disolver aproximadamente 10 µg de la muestra de prueba en 50 µL de la <i>solución reductora</i> y agregar aproximadamente 2.5 µL de la <i>solución madre 3</i>. Almacenar bajo nitrógeno o argón durante 2 horas a temperatura ambiente en un lugar oscuro. Para lograr la reacción de piridiletilación, agregar aproximadamente 2 µL de 4-vinilpiridina a la solución de proteína, e incubar durante 2 horas adicionales a temperatura ambiente en un lugar oscuro. La proteína o péptido se desaliniza por recolección de la fracción de proteína o péptido luego de una separación por HPLC en fase reversa. La muestra recolectada se puede secar en una centrifuga de vacío antes de la hidrólisis ácida.</p>		
<p><b>Método 9</b></p>		
<p>La reducción de cisteína-cistina y la alquilación se logran a través de una reacción de carboximetilación en fase líquida.</p>		
<p>Soluciones madre: Preparar según se indica en el <i>Método 8</i>.</p>		
<p>Solución de carboximetilación: Preparar una solución que contenga 100 mg de yodoacetamida por mL de etanol.</p>		
<p>Solución amortiguadora: Usar la <i>solución reductora</i>, preparada según se indica en el <i>Método 8</i>.</p>		
<p><b>Procedimiento:</b> Disolver la muestra de prueba en 50 µL de la <i>solución amortiguadora</i> y agregar aproximadamente 2.5 µL de la <i>solución madre 3</i>. Almacenar bajo nitrógeno o argón durante 2 horas</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>a temperatura ambiente en un lugar oscuro. Agregar la <i>solución de carboximetilación</i> en una relación de 1.5 veces el contenido teórico total de tioles, e incubar durante 30 minutos adicionales a temperatura ambiente en un lugar oscuro. [Nota: Si el contenido de tioles de la proteína se desconoce, agregar 5 µL de yodoacetamida 100 mM por cada 20 nmol de proteína presente.] La reacción se detiene agregando un exceso de 2-mercaptoetanol. La proteína o péptido se desaliniza por recolección de la fracción de proteína o péptido luego de una separación por HPLC en fase reversa. La muestra recolectada se puede secar en una centrifuga de vacío antes de la hidrólisis ácida. La S-carboxiamidometil-cisteína formada se convierte en S-carboximetil-cisteína durante la hidrólisis ácida.</p>		
<p><b>Método 10</b></p>		
<p>La cisteína-cistina se hace reaccionar con el ácido ditiodiglicólico o el ácido ditiodipropiónico para producir un disulfuro mixto. [Nota: La elección del ácido ditiodiglicólico o del ácido ditiodipropiónico depende de la resolución requerida por el método de análisis de aminoácidos.]</p>		
<p><i>Solución reductora:</i> una solución que contenga 10 mg de ácido ditiodiglicólico (o ácido ditiodipropiónico) por mL de hidróxido de sodio 0.2 M.</p>		
<p><b>Procedimiento:</b> Transferir aproximadamente 20 µg de la muestra de prueba a un tubo de hidrólisis y agregar 5 µL de la <i>solución reductora</i>. Agregar</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>10 µL de alcohol isopropílico y luego eliminar todo el líquido de la muestra mediante centrifugación al vacío. Luego, hidrolizar la muestra usando el <i>Método 1</i>. La ventaja de este método es que no se derivatizan otros residuos aminoacídicos por reacciones secundarias y no es necesario desalinizar la muestra antes de la hidrólisis.</p>		
<p><b>Método 11</b></p>		
<p>La asparagina y la glutamina se convierten en ácido aspártico y ácido glutámico, respectivamente, durante la hidrólisis ácida. Los residuos de asparagina y ácido aspártico se suman y se representan con Asx, y los residuos de glutamina y ácido glutámico se suman y se representan con Glx. Las proteínas o péptidos pueden hacerse reaccionar con bis(1,1-trifluoroacetoxi)yodobenceno (BTI) para convertir los residuos de asparagina y glutamina en residuos de ácido diaminopropiónico y ácido diaminobutírico, respectivamente, en la hidrólisis ácida. Estas conversiones permiten al analista determinar el contenido de asparagina y glutamina de una proteína o péptido en presencia de residuos de ácido aspártico y ácido glutámico.</p>		
<p><i>Soluciones reductoras:</i> Preparar y filtrar tres soluciones: una solución de ácido trifluoroacético 10 mM (<i>Solución 1</i>), una solución de clorhidrato de guanidina 5 M y ácido trifluoroacético 10 mM (<i>Solución 2</i>) y una solución recién preparada de dimetilformamida que contenga 36 mg de BTI por mL (<i>Solución 3</i>).</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p><b>Procedimiento:</b> A un tubo de hidrólisis limpio, transferir aproximadamente 200 µg de la muestra de prueba y agregar 2 mL de la <i>solución 1</i> o la <i>solución 2</i> y 2 mL de la <i>solución 3</i>. Sellar el tubo de hidrólisis al vacío. Calentar la muestra a 60 °C durante 4 horas en un lugar oscuro. Luego, dializar la muestra con agua para eliminar el exceso de reactivos. Extraer la muestra dializada tres veces con volúmenes iguales de acetato de <i>n</i>-butilo y luego liofilizar. Después, se puede realizar la hidrólisis ácida de la proteína o péptido usando los procedimientos descritos previamente. Los residuos de ácido α,β-diaminopropiónico y ácido α-γ-diaminobutírico típicamente no se resuelven de los residuos de lisina en la cromatografía de intercambio iónico basada en el análisis de aminoácidos. Por lo tanto, cuando se usa el intercambio iónico para separar los aminoácidos, el contenido de asparagina y glutamina es la diferencia cuantitativa entre el ácido aspártico y ácido glutámico determinados por hidrólisis ácida sin derivatizar y el contenido que se obtiene por derivatización con BTI. [Nota: El contenido determinado para treonina, metionina, cisteína, tirosina e histidina puede cambiar por la derivatización con BTI; se debe realizar una hidrólisis sin BTI si el analista está interesado en la composición de estos otros residuos de aminoácidos.]</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p><b>PRINCIPIOS GENERALES DE LAS METODOLOGÍAS DE ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS</b></p>		
<p>Existen muchas técnicas de análisis de aminoácidos y la elección de una de estas técnicas a menudo depende de la sensibilidad que requiera la valoración. En general, aproximadamente la mitad de las técnicas de análisis de aminoácidos empleadas se basan en la separación de los aminoácidos libres mediante cromatografía de intercambio iónico seguida por derivatización postcolumna (ej., con ninhidrina u o-ftalaldehído). Las técnicas de detección postcolumna se pueden utilizar con muestras que contienen pequeñas cantidades de los componentes de las soluciones amortiguadoras, tales como sales y urea, y por lo general necesitan entre 5 y 10 µg de muestra de proteína por análisis. Las demás técnicas de aminoácidos generalmente involucran la derivatización precolumna de los aminoácidos libres (ej., isotiocianato de fenilo; carbamato de 6-aminoquinolil-<i>N</i>-hidroxisuccinimidilo u o-ftalaldehído; cloruro de (dimetilamino) azobencensulfonilo; 9-fluorenilmetil cloroformiato; y 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol) seguida de HPLC en fase reversa. Las técnicas de derivatización precolumna son muy sensibles y por lo general necesitan entre 0.5 y 1.0 µg de la muestra de proteína por análisis, aunque pueden ser influenciadas por sales amortiguadoras presentes en las muestras. Las técnicas de</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>derivatización precolumna también pueden producir múltiples derivados de un aminoácido dado, lo cual complica la interpretación de los resultados. Las técnicas de derivatización postcolumna generalmente están menos influenciadas por variaciones en el desempeño de la valoración que las técnicas de derivatización precolumna.</p>		
<p>Se pueden usar los siguientes <i>métodos</i> para el análisis cuantitativo de aminoácidos. Los instrumentos y reactivos para estos procedimientos están disponibles comercialmente. Además, existen muchas modificaciones de estas metodologías con diferentes preparaciones de reactivos, procedimientos de reacción y sistemas cromatográficos. Los parámetros específicos pueden variar según los equipos y procedimientos usados. Muchos laboratorios usan más de una técnica de análisis de aminoácidos para aprovechar las ventajas de cada una. En cada uno de estos <i>métodos</i>, la señal analógica se visualiza mediante un sistema de captación de datos y la respuesta analítica (área bajo la curva, altura o factor respuesta) de los picos se integran con fines de cuantificación.</p>		
<p><b>Método 1—Detección postcolumna con ninhidrina</b></p>		
<p>La cromatografía de intercambio iónico con detección postcolumna con ninhidrina es uno de los métodos más comúnmente usados para el análisis cuantitativo de aminoácidos. Por lo</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>general, se emplea un sistema de intercambio catiónico a base de litio (Li) para el análisis de muestras fisiológicas más complejas y un sistema de intercambio catiónico a base de sodio (Na), que es más rápido, para mezclas de aminoácidos más simples obtenidas de hidrolizados proteicos (que típicamente contienen 17 aminoácidos). La separación de los aminoácidos en una columna de intercambio iónico se logra a través de una combinación de cambios en el pH y en la fuerza catiónica. A menudo se emplea un gradiente de temperatura para mejorar la separación.</p>		
<p>Cuando el aminoácido reacciona con la ninhidrina, el reactante adquiere un color púrpura o amarillo característico. Los aminoácidos, a excepción de los iminoácidos, dan un color púrpura y muestran máxima absorción a 570 nm. Los imino ácidos, como por ejemplo la prolina, dan un color amarillo y muestran una absorción máxima a 440 nm. La reacción postcolumna entre la ninhidrina y cada aminoácido eluido de la columna se detecta a 440 y 570 nm, y el cromatograma obtenido se usa para determinar la composición de aminoácidos.</p>		
<p>Se considera que el límite de detección es 10 pmol para la mayoría de los derivados de aminoácidos, pero es 50 pmol para la prolina. Se obtiene una respuesta lineal entre 20 y 500 pmol con coeficientes de correlación superiores a 0.999. Para obtener buenos datos de composición, es mejor contar con muestras de más de 1 µg antes</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
de la hidrólisis para este análisis de aminoácidos de proteínas o péptidos.		
<b>Método 2—Detección fluorométrica postcolumna con OPA</b>		
El o-ftalaldehído (OPA) reacciona con las aminas primarias en presencia de un tiol para formar productos de isoindol altamente fluorescentes. Esta reacción se utiliza para la derivatización postcolumna en el análisis de aminoácidos por cromatografía de intercambio iónico. La regla de separación es la misma que la del <i>método 1</i> . Los instrumentos y reactivos para esta forma de análisis de aminoácidos están disponibles comercialmente. Existen muchas modificaciones de este método.		
Si bien el OPA no reacciona con aminas secundarias (iminoácidos, como por ejemplo la prolina) para formar sustancias fluorescentes, la oxidación con hipoclorito de sodio o cloramina T permite que las aminas secundarias reaccionen con OPA. El procedimiento emplea una columna de intercambio catiónico fuertemente ácida para la separación de aminoácidos libres seguida de una oxidación postcolumna con hipoclorito de sodio o cloramina T y derivatización postcolumna usando OPA y un compuesto tiol, como por ejemplo <i>N</i> -acetil-L-cisteína y 2-mercaptoetanol. La derivatización de aminoácidos primarios no se altera perceptiblemente con el aporte continuo de hipoclorito de sodio o cloramina T.		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>La separación de los aminoácidos en una columna de intercambio iónico se logra a través de una combinación de cambios en el pH y en la fuerza catiónica. Después de la derivatización postcolumna con OPA de los aminoácidos eluidos, el reactante pasa a través de un detector fluorométrico. La intensidad de la fluorescencia de los aminoácidos derivatizados con OPA tienen una longitud de onda de excitación de 348 nm y una longitud de onda de emisión de 450 nm.</p>		
<p>Se considera que el límite de detección es de unas pocas decenas de picomol para la mayoría de los derivados de aminoácidos. La respuesta es lineal entre unos pocos picomoles y unas pocas decenas de nanomoles. Para obtener buenos datos de composición en este análisis de aminoácidos de proteínas o péptidos, es mejor contar con muestras de más de 500 ng antes de la hidrólisis.</p>		
<p><b>Método 3—Derivatización precolumna con PITC</b></p>		
<p>El fenilisotiocianato (PITC) reacciona con los aminoácidos para formar derivados de feniltiocarbamilo (PTC) que se pueden detectar con alta sensibilidad a 254 nm. Por lo tanto, se usa la derivatización precolumna de aminoácidos con PITC seguida por separación por HPLC en fase reversa con detección UV para analizar la composición de aminoácidos.</p>		
<p>Después de eliminar el reactivo al vacío, los aminoácidos derivatizados se pueden almacenar secos y congelados durante varias semanas sin degradación significativa. Si la solución para</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
inyección se mantiene fría, no hay pérdida perceptible en la respuesta cromatográfica después de tres días.		
La separación de los aminoácidos-PTC por HPLC en fase reversa con una columna ODS (octadecilsililo) se logra a través de una combinación de cambios en las concentraciones de acetonitrilo y en la fuerza iónica de la solución amortiguadora. Los aminoácidos-PTC eluidos de la columna se detectan a 254 nm.		
Se considera que el límite de detección es 1 pmol para la mayoría de los aminoácidos derivatizados. Se obtiene una respuesta lineal entre 20 y 500 pmol con coeficientes de correlación superiores a 0.999. Para obtener buenos datos de la composición, en este análisis de aminoácidos de proteínas o péptidos es mejor contar con una muestra de más de 500 ng de proteína o péptido antes de la hidrólisis.		
<b>Método 4—Derivatización precolumna con AQC</b>		
Se usa la derivatización precolumna de aminoácidos con 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC) y después se separan por HPLC en fase reversa con detección fluorométrica.		
El AQC reacciona con los aminoácidos para formar derivados de urea estables, fluorescentes y no simétricos (aminoácidos-AQC) que se pueden someter fácilmente al análisis por HPLC en fase reversa. Por lo tanto, se usa la derivatización precolumna de aminoácidos con AQC seguida de		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>la separación por HPLC en fase reversa para analizar la composición de aminoácidos.</p>		
<p>La separación de los aminoácidos-AQC en una columna ODS se logra a través de una combinación de cambios en las concentraciones de acetonitrilo y el buffer. La detección de fluorescencia selectiva de los derivados con una longitud de onda de excitación de 250 nm y una longitud de onda de emisión de 395 nm permite la inyección directa de la mezcla de reacción sin ninguna interferencia significativa del único subproducto fluorescente importante del reactivo, la 6-aminoquinolina. El exceso de reactivo se hidroliza rápidamente (<math>t_{1/2} &lt; 15</math> segundos) para producir 6-aminoquinolina-<i>N</i>-hidroxisuccinimida y dióxido de carbono y después de 1 minuto no se puede producir ninguna otra derivatización.</p>		
<p>Las respuestas analíticas (área bajo la curva, altura o factor respuesta) de los picos para los aminoácidos-AQC esencialmente no cambian durante al menos 1 semana a temperatura ambiente y los derivados tienen más que suficiente estabilidad para permitir el análisis cromatográfico automatizado durante la noche.</p>		
<p>Se considera que el límite de detección está entre aproximadamente 40 y 320 fmol para cada aminoácido, a excepción de la cisteína (Cys). El límite de detección para la Cys es aproximadamente 800 fmol. Se obtiene una respuesta lineal entre 2.5 y 200 <math>\mu</math>M con coeficientes de correlación superiores a 0.999. Se</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>pueden obtener buenos datos de composición a partir del análisis de hidrolizados proteicos derivatizados que contengan tan solo 30 ng de proteína o péptido.</p>		
<p><b>Método 5—Derivatización precolumna con OPA</b></p>		
<p>Se usa la derivatización precolumna de aminoácidos con o-ftalaldehído (OPA) y luego se separan por HPLC en fase reversa con detección fluorométrica. Esta técnica no detecta los aminoácidos que existen como aminas secundarias (como la prolina).</p>		
<p>El OPA junto con un reactivo tiol reacciona con grupos amino primarios para formar productos isoindólicos altamente fluorescentes. Se puede usar 2-mercaptoetanol y ácido 3-mercaptopropiónico como tiol. El OPA por sí mismo no muestra fluorescencia y por lo tanto no produce picos que interfieren. Además, su solubilidad y estabilidad en soluciones acuosas, junto con la rápida cinética de reacción permiten la derivatización y análisis automatizados usando un muestreador automático para mezclar la muestra con el reactivo. Sin embargo, la falta de reactividad con aminoácidos secundarios ha sido una desventaja importante. Este método no detecta los aminoácidos que son aminas secundarias (prolina). Para compensar esta desventaja, esta técnica se puede combinar con la técnica descrita en el <i>Método 7</i> o en el <i>Método 8</i>.</p>		
<p>A la derivatización precolumna de aminoácidos con OPA le sigue la separación por HPLC en fase</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>reversa. Debido a la inestabilidad de los derivados aminoácidos-OPA, la separación y el análisis por HPLC se realizan inmediatamente después de la derivatización. El cromatógrafo de líquidos está equipado con un detector fluorométrico para la detección de aminoácidos derivatizados. La intensidad de fluorescencia de los aminoácidos derivatizados con OPA se detecta a una longitud de onda de excitación de 348 nm y una longitud de onda de emisión de 450 nm.</p>		
<p>Se ha reportado el límite de detección de solo 50 fmol a través de fluorescencia, aunque el límite práctico de análisis se mantiene en 1 pmol.</p>		
<p><b>Método 6—Derivatización precolumna con DABS-Cl</b></p>		
<p>Se usa derivatización precolumna de aminoácidos con cloruro de (dimetilamino) azobencenosulfonilo (DABS-Cl) y luego se separan por HPLC en fase reversa con detección en la región de luz visible.</p>		
<p>El DABS-Cl es un reactivo cromóforo empleado para marcar aminoácidos. Los aminoácidos marcados con DABS-Cl (aminoácidos-DABS) son muy estables y muestran la máxima absorción a 436 nm.</p>		
<p>Los aminoácidos-DABS, los 19 derivados de aminoácidos naturales, se pueden separar en una columna ODS de HPLC en fase reversa empleando sistemas de gradientes constituidos por una mezcla de acetonitrilo y una solución amortiguadora acuosa. Los aminoácidos-DABS</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
separados que eluyen de la columna se detectan a 436 nm en la región visible.		
Este método puede analizar los iminoácidos, como por ejemplo la prolina, junto con los aminoácidos, con igual sensibilidad. El método de derivatización con DABS-Cl permite la cuantificación simultánea de residuos de triptófano mediante hidrólisis previa de la proteína o péptido con ácidos sulfónicos, como por ejemplo ácido mercaptoetanosulfónico, ácido <i>p</i> -toluensulfónico o ácido metanosulfónico, descritos en el <i>Método 2 de Hidrólisis de Proteínas</i> . Los otros residuos sensibles a los ácidos, asparagina y glutamina, también se pueden analizar mediante la conversión previa en ácido diaminopropiónico y ácido diaminobutírico, respectivamente, tratando la proteína o péptido con BTI, descrito en el <i>Método 11 de Hidrólisis de Proteínas</i> .		
El aminoácido no proteínogénico, norleucina, no se puede usar como un estándar interno en este método ya que eluye en una región cromatográfica abundante en picos de aminoácidos primarios. La nitrotirosina se puede usar como estándar interno ya que eluye en una región despejada.		
El límite de detección de aminoácidos-DABS es aproximadamente 1 pmol. Se pueden analizar cuantitativamente de 2 a 5 pmol de cada aminoácido-DABS con confiabilidad y solo se necesitan entre 10 ng y 30 ng del hidrolizado proteico tratado con DABS para cada análisis.		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p><b>Método 7—Derivatización precolumna con FMOC-CI</b></p>		
<p>Se usa derivatización precolumna de aminoácidos con cloroformiato de 9-fluorenilmetilo (FMOC-CI) y luego se separan por HPLC en fase reversa con detección fluorométrica.</p>		
<p>El FMOC-CI reacciona con aminoácidos primarios y secundarios para formar productos altamente fluorescentes. La reacción del FMOC-CI con aminoácidos se realiza bajo condiciones suaves, en solución acuosa y se completa en 30 segundos. Los derivados son estables y solo se degrada el derivado de histidina. Si bien el FMOC-CI es fluorescente por sí mismo, el exceso de reactivo y los subproductos fluorescentes se pueden eliminar sin pérdida de aminoácidos-FMOC.</p>		
<p>Los aminoácidos-FMOC se separan por HPLC en fase reversa usando una columna ODS. La separación se lleva a cabo mediante elución por gradiente que varía linealmente de una mezcla de solución amortiguadora de ácido acético, metanol y acetonitrilo (50:40:10) a una mezcla de acetonitrilo y solución amortiguadora de ácido acético (50:50). En estas condiciones, se separan 20 derivados de aminoácidos en 20 minutos. Cada derivado que eluye de la columna se observa a través de un detector fluorométrico ajustado a una longitud de onda de excitación de 260 nm y una longitud de onda de emisión de 313 nm.</p>		
<p>El límite de detección se encuentra en el intervalo inferior de fmol. Para la mayoría de los</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
aminoácidos la respuesta es lineal entre 0.1 y 50 µM.		
<b>Método 8—Derivatización precolumna con NBD-F</b>		
Se usa la derivatización precolumna de aminoácidos con 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-F) y después se separan por HPLC en fase reversa con detección fluorométrica.		
El 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-F) reacciona con aminoácidos primarios y secundarios para formar productos altamente fluorescentes. Los aminoácidos se derivatizan con NBD-F calentándolos a 60 °C durante 5 minutos.		
Los derivados aminoácidos-NBD se separan en una columna ODS de HPLC en fase reversa empleando un sistema de elución por gradiente constituido por una mezcla de acetonitrilo y una solución amortiguadora acuosa. En estas condiciones se separan 17 derivados de aminoácidos en 35 minutos. Se puede usar el ácido e-aminocaproico como estándar interno ya que eluye en una región cromatográfica despejada. Cada derivado que eluye de la columna se controla mediante un detector fluorométrico ajustado a una longitud de onda de excitación de 480 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm.		
La sensibilidad de este método es casi igual que la del método de derivatización precolumna con OPA (Método 5), excluyendo la prolina, que no reacciona con el OPA. Esto puede ser una ventaja del NBD-F con respecto al OPA.		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>El límite de detección para cada aminoácido es aproximadamente 10 fmol. El perfil analítico se logra con aproximadamente 1.5 mg de hidrolizado proteico en la mezcla final de reacción de marcación precolumna para HPLC.</p>		
<b>CÁLCULO Y ANÁLISIS DE DATOS</b>		
<p>Quando se determina el contenido de aminoácidos de un hidrolizado de proteína o péptido, se debe tener en cuenta que el paso de hidrólisis ácida destruye el triptófano y la cisteína. La serina y la treonina se destruyen parcialmente con la hidrólisis ácida, mientras que la isoleucina y la valina podrían escindirse solo parcialmente. La metionina puede oxidarse durante la hidrólisis ácida y algunos aminoácidos (ej., glicina y serina) son contaminantes comunes. La aplicación de un vacío adecuado (menos de 200 µm de mercurio o 26.7 Pa) o la introducción de un gas inerte (argón) en la cámara gaseosa del recipiente de reacción durante la hidrólisis en fase de vapor puede reducir la destrucción oxidativa. Por lo tanto, los resultados cuantitativos obtenidos para cisteína, triptófano, treonina, isoleucina, valina, metionina, glicina y serina de un hidrolizado de proteínas o péptidos pueden variar y pueden requerir posterior investigación y consideración.</p>		
<b>Cálculos</b>		
<b>Porcentaje molar de los aminoácidos</b>		
<p>Es el número de residuos de cada aminoácido por cada 100 residuos en una proteína o péptido. Este resultado puede ser útil para evaluar los datos de</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>análisis de aminoácidos cuando se desconoce el peso molecular de la proteína o péptido a investigar. Esta información se puede usar para corroborar la identidad de una proteína o péptido y tiene otras aplicaciones. Identificar e integrar cuidadosamente los picos obtenidos según se indica para cada <i>Procedimiento</i>. Calcular el porcentaje molar de cada aminoácido presente en la muestra de prueba, por la fórmula:</p>		
$100r_U/r$		
<p>en donde <math>r_U</math> es la respuesta correspondiente al pico, en nmol, del aminoácido en análisis y</p>		
<p><math>r</math> es la suma de respuestas correspondientes a los picos, en nmol, de todos los aminoácidos presentes en la muestra de prueba.</p>		
<p>La comparación entre el porcentaje molar de aminoácidos en análisis y los datos de proteínas conocidas puede ayudar a establecer o corroborar la identidad de la proteína o péptido de muestra.</p>		
<p><b>Muestras de Proteínas Desconocidas</b></p>		
<p>Esta técnica de análisis de datos se puede usar para estimar la concentración proteica de una muestra de proteína o péptido desconocidos usando los datos de análisis de aminoácidos. Calcular la masa, en <math>\mu\text{g}</math>, de cada aminoácido recuperado, con la fórmula:</p>		
$mM_r / 1000$		
<p>en donde <math>m</math> es la cantidad recuperada, en nmoles, del aminoácido en análisis; y</p>		
<p><math>M_r</math> es el peso molecular promedio para ese aminoácido, corregido por el peso molecular del</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>agua que se eliminó durante la formación de la unión peptídica.</p>		
<p>La suma de las masas de los aminoácidos recuperados permite estimar la masa total de la proteína o péptido analizado después de corregir adecuadamente por los aminoácidos destruidos parcial o completamente. Si se dispone del peso molecular de la proteína o péptido desconocido (es decir, por análisis SDS-PAGE o espectrometría de masas), se puede predecir la composición de aminoácidos de la proteína desconocida. Calcular el número de residuos de cada aminoácido, por la fórmula:</p>		
<p><math display="block">m / (1000 M / M_{rt})</math></p>		
<p>en donde m es la cantidad recuperada, en nmol, del aminoácido en análisis;</p>		
<p>M es la masa total, en µg, de la proteína; y</p>		
<p>M<sub>rt</sub> es el peso molecular de la proteína desconocida.</p>		
<p><b>Muestras de proteínas conocidas</b></p>		
<p>Esta técnica de análisis de datos se puede usar para investigar la composición de aminoácidos y la concentración proteica de una muestra de proteína o péptido de peso molecular y composición aminoacídica conocidos usando los datos de análisis de aminoácidos. Cuando se conoce la composición de la proteína o péptido que se está analizando, se puede aprovechar el hecho de que algunos aminoácidos se recuperan bien, mientras que la recuperación de otros aminoácidos puede verse comprometida debido a la destrucción total o</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>parcial (p. ej., triptófano, cisteína, treonina, serina, metionina), la escisión incompleta de uniones (es decir, para isoleucina y valina) y la contaminación por aminoácidos libres (es decir, por glicina y serina).</p>		
<p>Debido a que los aminoácidos que se recuperan representan bien a la proteína o péptido, estos se eligen para cuantificarla. Los aminoácidos que se recuperan bien son, generalmente, aspartato-asparagina, glutamato-glutamina, alanina, leucina, fenilalanina, lisina y arginina. Esta lista se puede modificar según la experiencia propia con el sistema de análisis utilizado. Dividir la cantidad, en nmol, de cada uno de los aminoácidos recuperados por el número esperado de residuos de ese aminoácido, con el fin de obtener el contenido proteico basado en cada aminoácido recuperado. Promediar los resultados de contenido proteico calculados. El contenido proteico determinado para cada uno de los aminoácidos bien recuperados se debe distribuir uniformemente en torno a la media. Descartar los valores de contenido proteico para esos aminoácidos que se alejan demasiado de la media. Generalmente, una variación mayor de 5 % con respecto a la media se considera inaceptable. Recalcular la media del contenido proteico de los valores restantes para obtener el contenido proteico de la muestra. Dividir el contenido de cada aminoácido por el contenido proteico medio calculado para determinar la composición de aminoácidos de la muestra.</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
Calcular el error relativo de composición, en porcentaje, con la fórmula:		
$100m/m_s$		
En donde m es la cantidad determinada experimentalmente, en nmol por residuo aminoacídico, del aminoácido en análisis;		
y $m_s$ es el valor conocido para los residuos de ese aminoácido.		
El error relativo composicional promedio es el promedio de los valores absolutos de los errores relativos composicionales de los aminoácidos individuales, excluyendo típicamente el triptófano y la cisteína de este cálculo. El error relativo composicional promedio puede proporcionar información importante acerca de la estabilidad de los análisis en función del tiempo. La concordancia de la composición aminoacídica entre la muestra de proteína o péptido y la composición conocida se puede usar para corroborar la identidad y pureza de la proteína o péptido en la muestra.		
<b>APÉNDICE</b>		
<b>Procedimientos de análisis de aminoácidos</b>		
Se presentan los ejemplos de procedimientos específicos para cada <i>método</i> descrito en <i>Principios Generales de las Metodologías de Análisis de Aminoácidos</i> .		
<b>•Método 1—Detección postcolumna con ninhidrina</b>		
A continuación, se presenta un método para detección postcolumna con ninhidrina. Existen		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
muchos otros métodos, con instrumental y reactivos disponibles comercialmente.		
<b>Preparación de la fase móvil:</b>		
<b>Solución A</b> —Transferir aproximadamente 1.7 g de citrato de sodio anhidro y 1.5 mL de ácido clorhídrico a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y diluir a volumen con agua y mezclar. Ajustar, si fuera necesario, con ácido clorhídrico hasta un pH de 3.0.		
<b>Solución B</b> —Transferir aproximadamente 1.7 g de citrato de sodio anhidro y 0.7 mL de ácido clorhídrico a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y diluir a volumen con agua y mezclar. Ajustar con ácido clorhídrico, si fuera necesario, hasta un pH de 4.3.		
<b>Solución C</b> —Preparar una solución que contenga 5 % de cloruro de sodio, 1.9% de citrato de sodio anhidro y 0.1 % de fenol en agua y ajustar hasta un pH de 6.		
<b>Solución Regeneradora de la Columna</b> — Preparar una solución que contenga 0.8 % de hidróxido de sodio en agua y ajustar hasta un pH de 13.		
<b>Fase Móvil</b> —Usar mezclas variables de <i>solución A</i> , <i>solución B</i> y <i>solución C</i> según se indica en <i>sistema cromatográfico</i> .		
<b>Reactivo postcolumna:</b> Transferir aproximadamente 18 g de ninhidrina y 0.7 g de hidrindantina a 900 mL de una solución que contenga 76.7 % de dimetil sulfóxido, 0.7 % de acetato de litio dihidratado y 0.1 % de ácido acético		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>y mezclar durante un mínimo de 3 horas bajo un gas inerte, como por ejemplo nitrógeno. [Nota—Este reactivo es estable durante 30 días si se mantiene a una temperatura entre 2 y 8 °C bajo un gas inerte.]</p>		
<p><b>Solución amortiguadora:</b> Preparar una solución que contenga 2 % de citrato de sodio anhidro, 1 % de ácido clorhídrico, 0.5 % de tiodiglicol y 0.1 % de ácido benzoico en agua y ajustar hasta un pH de 2.</p>		
<p><b>Sistema cromatográfico:</b> Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector con filtros de interferencia apropiados a 440; 570 ó 690 nm y una columna de 4.0 mm × 120 mm con empaque de copolímero de estireno-divinilbenceno sulfonado de 7.5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 14 mL por hora. Programar el sistema del siguiente modo. Inicialmente, equilibrar la columna con <i>solución A</i>; a los 25 minutos, cambiar la composición de la <i>fase móvil</i> a 100 % de <i>solución B</i>; y a los 37 minutos, cambiar la composición al 100 % de <i>solución C</i>. A los 75 minutos de la corrida, eluye el último aminoácido de la columna y se regenera la columna con la <i>solución regeneradora de la columna</i> durante 1 minuto. Después equilibrar la columna con <i>solución A</i> durante 11 minutos antes de la siguiente inyección. Programar la temperatura de la columna del siguiente modo. La temperatura inicial es 48 °C; después de 11.5 minutos, aumentar la temperatura a 65 °C a una velocidad de 3 °C por minuto;</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>aproximadamente a los 35 minutos, aumentar la temperatura a 77 °C a una velocidad de 3 °C por minuto; y finalmente, aproximadamente a los 52 minutos, disminuir la temperatura a 48 °C a una velocidad de 3 °C por minuto.</p>		
<p><b>Procedimiento y reacción postcolumna:</b> Reconstituir el hidrolizado proteico o peptídico liofilizado en la <i>solución amortiguadora</i>, inyectar una cantidad adecuada en el cromatógrafo y proceder según se indica en <i>sistema cromatográfico</i>. Cuando los aminoácidos eluyen de la columna, se mezclan con el <i>reactivo postcolumna</i>, que se suministra a una velocidad de flujo de 7 mL por hora, a través de una llave T. Después de mezclar, el efluente de la columna y el <i>reactivo postcolumna</i> pasan a través de un reactor tubular a una temperatura de 135°C, donde se forma un color púrpura o amarillo característico. Desde el reactor, el líquido pasa a través de un colorímetro con una celda de flujo de 12 mm. La luz que emerge de la celda se divide en tres haces que son analizados por el detector con filtros de interferencia a 440; 570 ó 690 nm. La señal de 690 nm se puede restar electrónicamente de las otras señales para obtener mejores relaciones señal-ruido. Las señales de 440 nm (iminoácidos) y de 570 nm (aminoácidos) se pueden sumar para simplificar el manejo de datos.</p>		
<p><b>•Método 2—Detección fluorométrica postcolumna con OPA</b></p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
A continuación, se presenta un método de detección fluorométrica postcolumna con OPA.		
<b>Preparación de la fase móvil:</b>		
<b>Solución A</b> —Preparar una solución de hidróxido de sodio, ácido cítrico y alcohol en agua de grado HPLC con una concentración de sodio 0.2 N y que contenga 7 % de alcohol (p/v), ajustada hasta un pH de 3.2.		
<b>Solución B</b> —Preparar una solución de hidróxido de sodio y ácido cítrico en agua de grado HPLC con una concentración de sodio 0.6 N, ajustada a un pH de 10.0.		
<b>Solución C</b> —hidróxido de sodio 0.2 N.		
<b>Fase móvil</b> —Usar mezclas variables de <i>solución A</i> , <i>solución B</i> y <i>solución C</i> según se indica en <i>sistema cromatográfico</i> .		
<b>Preparación del reactivo postcolumna:</b>		
<b>Solución amortiguadora alcalina</b> —Preparar una solución que contenga carbonato de sodio 384 mM, ácido bórico 216 mM y sulfato de potasio 108 mM y ajustar hasta un pH de 10.0.		
<b>Reactivo de hipoclorito</b> —Agregar 0.4 mL de una solución de hipoclorito de sodio (10 % de cloro) a 1 L de la <i>solución amortiguadora alcalina</i> . [Nota—La solución de hipoclorito es estable durante 2 semanas.]		
<b>Reactivo OPA</b> —Transferir 2 g de <i>N</i> -acetil-l-cisteína y 1.6 g de OPA a un matraz volumétrico de 15 mL, disolver con alcohol, diluir a volumen con alcohol y mezclar. Transferir esta solución y 4 mL de una solución acuosa al 10 % de Polioxietileno		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
(23) lauril éter a un matraz volumétrico de 1 L, diluir con 980 mL de <i>solución amortiguadora alcalina</i> y mezclar.		
<p><b>Sistema cromatográfico:</b> Equipar el cromatógrafo de líquidos con un detector fluorométrico ajustado a una longitud de onda de excitación de 348 nm y una longitud de onda de emisión de 450 nm y con una columna de 4.0 mm × 150 mm con empaque de material L17 de 7.5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 0.3 mL por minuto y la temperatura de la columna se ajusta a 50 °C. Programar el sistema del siguiente modo. Equilibrar la columna con <i>solución A</i>; durante los siguientes 20 minutos, cambiar linealmente la composición de la <i>fase móvil</i> a 85 % de <i>Solución A</i> y 15 % de <i>solución B</i>; luego cambiar abruptamente a 40 % de <i>solución A</i> y 60 % de <i>solución B</i>; durante los siguientes 18 minutos, cambiar linealmente la composición a 100 % de <i>solución B</i> y mantenerla durante 7 minutos; luego cambiar abruptamente a 100 % de <i>solución C</i> y mantenerla durante 6 minutos; luego cambiar abruptamente a la <i>solución A</i>, mantener esta composición durante los siguientes 8 minutos.</p>		
<p><b>Procedimiento y reacción postcolumna:</b> Inyectar en el cromatógrafo aproximadamente 1.0 nmol de cada aminoácido en análisis y proceder según se indica en el <i>Sistema cromatográfico</i>. Cuando el efluente deja la columna, se mezcla con el <i>reactivo de hipoclorito</i>. La mezcla pasa a través del primer reactor postcolumna que es un tubo de acero</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>inoxidable de 0.5 mm × 2 m. Inmediatamente a continuación del primer reactor postcolumna se coloca un segundo reactor postcolumna de diseño similar que se usa para la reacción postcolumna con OPA. La velocidad de flujo tanto para el <i>reactivo de hipoclorito</i> como para el <i>reactivo OPA</i> es 0.2 mL por minuto, dando como resultado una velocidad de flujo total (es decir, <i>reactivo de hipoclorito</i>, <i>Reactivo OPA</i> y el efluente de la columna) de 0.7 mL por minuto que sale de los reactores posteriores al paso por la columna. Las reacciones postcolumna se realizan a 55 °C. Esto produce un tiempo de permanencia de aproximadamente 33 segundos en el reactor postcolumna con OPA. Después de la derivatización postcolumna, el efluente pasa a través del detector fluorométrico.</p>		
<p>•<b>Método 3—Derivatización precolumna con PITC</b></p>		
<p>A continuación, se presenta un método de derivatización precolumna con PITC.</p>		
<p><b>Preparación de la fase móvil:</b></p>		
<p><b>Solución A</b>—Preparar acetato de amonio 0.05 M, ajustado con ácido fosfórico a un pH de 6.8.</p>		
<p><b>Solución B</b>—Preparar acetato de amonio 0.1 M, ajustar con ácido fosfórico a un pH de 6.8 y luego preparar una mezcla de esta solución y acetonitrilo (1:1).</p>		
<p><b>Solución C</b>—Mezcla de acetonitrilo y agua (70:30).</p>		
<p><b>Fase Móvil</b>—Usar mezclas variables de <i>solución A</i>, <i>solución B</i> y <i>solución C</i> según se indica en <i>sistema cromatográfico</i>.</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<b>Preparación del reactivo de derivatización:</b>		
<b>Solución amortiguadora de acoplamiento</b> —una mezcla de acetonitrilo, piridina, trietilamina y agua (10:5:2:3).		
<b>Disolvente de la muestra</b> —Mezcla de agua y acetonitrilo (7:2).		
<b>Procedimiento de derivatización de la muestra:</b> Disolver la muestra de prueba liofilizada en 100 µL de <i>solución amortiguadora de acoplamiento</i> y luego secar en una centrifuga de vacío para eliminar todo el clorhidrato si se realizó un paso de hidrólisis de proteína. Disolver la muestra de prueba en 100 µL de <i>solución amortiguadora de acoplamiento</i> , agregar 5 µL de PITC e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. La muestra de prueba se seca nuevamente en una centrifuga de vacío y se disuelve en 250 µL de <i>disolvente de la muestra</i> .		
<b>Sistema cromatográfico:</b> Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 254 nm y una columna de 4.6 mm × 250 mm con empaque de material L1 de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1 mL por minuto y la temperatura de la columna se mantiene a 52 °C. Programar el sistema del siguiente modo. Equilibrar la columna con la <i>solución A</i> ; durante los siguientes 15 minutos, cambiar linealmente la composición de la <i>fase móvil</i> a 85 % de <i>solución A</i> y 15 % de <i>solución B</i> ; durante los siguientes 15 minutos, cambiar linealmente la composición a 50 % de <i>solución A</i> y 50 % de <i>solución B</i> ; luego		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>cambiar abruptamente a 100 % de <i>solución C</i> y mantenerla durante 10 minutos; luego cambiar abruptamente a 100 % de <i>solución A</i> y dejar que la columna se equilibre antes de la siguiente inyección.</p>		
<p><b>Procedimiento:</b> Inyectar en el cromatógrafo aproximadamente 1.0 nmol de cada aminoácido-PITC en análisis (10 µL de la muestra en el <i>disolvente de la muestra</i>) y proceder según se indica en <i>sistema cromatográfico</i>.</p>		
<p>•<b>Método 4—Derivatización de precolumna con AQC</b></p>		
<p>A continuación, se presenta un método de derivatización precolumna con AQC.</p>		
<p><b>Preparación de la fase móvil:</b></p>		
<p><b>Solución A—</b>Preparar una solución de acetato de sodio 140 mM y trietilamina 17 mM y ajustar con ácido fosfórico hasta un pH de 5.02.</p>		
<p><b>Solución B—</b>Mezcla de acetonitrilo y agua (60:40).</p>		
<p><b>Fase Móvil—</b>Usar mezclas variables de <i>solución A</i> y <i>solución B</i> según se indica en <i>sistema cromatográfico</i>.</p>		
<p><b>Procedimiento de derivatización de la muestra:</b> Disolver aproximadamente 2 µg de la muestra de prueba en 20 µL de ácido clorhídrico 15 mM y diluir con una solución amortiguadora de borato 0.2 M (pH 8.8) a 80 µL. Iniciar la derivatización agregando 20 µL de AQC10 mM en acetonitrilo y dejar que siga durante 10 minutos a temperatura ambiente.</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p><b>Sistema cromatográfico:</b> Equipar el cromatógrafo de líquidos con un detector fluorométrico ajustado a una longitud de onda de excitación de 250 nm, una longitud de onda de emisión de 395 nm y con una columna de 3.9 mm × 150 mm con empaque de material L1 de 4 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1 mL por minuto y la temperatura de la columna se mantiene a 37 °C. Programar el sistema del siguiente modo. Equilibrar la columna con la <i>solución A</i>; durante los siguientes 0.5 minutos, cambiar linealmente la composición de la <i>Fase Móvil</i> a 98 % de <i>solución A</i> y 2 % de <i>solución B</i>; luego durante los siguientes 14.5 minutos a 93 % de <i>Solución A</i> y 7 % de <i>solución B</i>; durante los siguientes 4 minutos a 87 % de <i>solución A</i> y 13 % de <i>Solución B</i>; durante los siguientes 14 minutos a 68 % de <i>solución A</i> y 32 % de <i>solución B</i>; luego cambiar abruptamente a 100 % de <i>solución B</i> para un lavado de 5 minutos; durante los siguientes 10 minutos, cambiar abruptamente a 100 % de <i>solución A</i> y dejar que la columna se equilibre antes de la siguiente inyección.</p>		
<p><b>Procedimiento:</b> Inyectar en el cromatógrafo aproximadamente 0.05 nmol de cada aminoácido-AQC en análisis y proceder según se indica en el <i>sistema cromatográfico</i>.</p>		
<p><b>•Método 5—Derivatización precolumna con OPA</b></p>		
<p>A continuación, se presenta un método de derivatización precolumna con OPA.</p>		
<p><b>Preparación de la fase móvil:</b></p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<b>Solución A</b> —Mezcla de acetato de sodio 100 mM (pH 7.2), metanol y tetrahidrofurano (900:95:5).		
<b>Solución B</b> —Metanol.		
<b>Fase Móvil</b> —Usar mezclas variables de <i>Solución A</i> y <i>Solución B</i> según se indica en <i>Sistema Cromatográfico</i> .		
<b>Reactivo de derivatización:</b> Disolver 50 mg de OPA en 1.25 mL de metanol (apto para secuenciación de proteínas). Agregar 50 µL de 2-mercaptoetanol y 11.2 mL de borato de sodio 0.4 M (pH 9.5) y mezclar. [Nota—El reactivo es estable durante 1 semana.]		
<b>Procedimiento de derivatización de la muestra:</b> Transferir aproximadamente 5 µL de la muestra de prueba a un recipiente adecuado, agregar 5 µL del reactivo de derivatización y mezclar. Después de 1 minuto, agregar no menos de 20 µL de acetato de sodio 0.1 M (pH 7.0). Usar 20 µL de esta solución para el análisis. [Nota—Se recomienda usar un estándar interno (p. ej., norleucina) para el análisis cuantitativo debido a variaciones potenciales en el volumen del reactivo en la derivatización de la muestra. La derivatización de la muestra se realiza de manera automatizada en línea. Debido a la inestabilidad de los derivados aminoácido-OPA, la separación y análisis por HPLC se realizan inmediatamente después de la derivatización.]		
<b>Sistema cromatográfico:</b> Equipar el cromatógrafo de líquidos con un detector fluorométrico ajustado a una longitud de onda de excitación de 348 nm y una longitud de onda de emisión de 450 nm y con		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>una columna de 4.6 mm × 75 mm con empaque de material L3 de 3 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1.7 mL por minuto y la temperatura de la columna se mantiene a 37 °C. Programar el sistema del siguiente modo. Equilibrar la columna con 92 % de <i>Solución A</i> y 8 % de <i>solución B</i>; durante los siguientes 2 minutos, cambiar la composición de la <i>Fase Móvil</i> a 83 % de <i>solución A</i> y 17 % de <i>solución B</i> y mantener durante 3 minutos más; después durante los siguientes 5 minutos cambiara 54 % de <i>solución A</i> y 46 % de <i>solución B</i> y mantener durante 2 minutos más; después durante los siguientes 2 minutos cambiar a 34 % de <i>solución A</i> y 66 % de <i>solución B</i> y mantener durante 1 minuto; después durante los siguientes 0.3 minutos cambiar a 20 % de <i>solución A</i> y 80 % de <i>solución B</i> y mantener durante 2.6 minutos más; y finalmente durante 0.6 minutos cambiar a 92 % de <i>solución A</i> y 8 % de <i>solución B</i> y mantener durante 0.6 minutos más.</p>		
<p><b>Procedimiento:</b> Inyectar aproximadamente 0.02 nmol de cada derivado aminoácido-OPA en análisis en el cromatógrafo y proceder según se indica en el <i>sistema cromatográfico</i>.</p>		
<p><b>•Método 6—Derivatización precolumna con DABS-Cl</b></p>		
<p>A continuación, se presenta un método de derivatización precolumna con DABS-Cl.</p>		
<p><b>Preparación de la fase móvil:</b></p>		
<p><b>Solución A</b>—acetato de sodio 25 mM (pH 6.5) que contenga 4 % de dimetilformamida.</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<b>Solución B</b> —acetonitrilo.		
<b>Fase Móvil</b> —Usar mezclas variables de <i>Solución A</i> y <i>Solución B</i> según se indica en sistema cromatográfico.		
<b>Preparación del reactivo de derivatización</b>		
<b>Solución amortiguadora de muestra:</b> bicarbonato de sodio 50 mM ajustado hasta un pH de 8.1.		
<b>Reactivo de derivatización:</b> Disolver 1.3 mg de DABS-Cl en 1 mL de acetonitrilo. [Nota—Este reactivo se prepara poco antes del paso de derivatización.]		
<b>Solución amortiguadora de dilución de la muestra:</b> Preparar una mezcla de fosfato de sodio 50 mM (pH 7.0) y alcohol (1:1).		
<b>Procedimiento de derivatización de la muestra:</b> Disolver la muestra de prueba en 20 µL de <i>solución amortiguadora de muestra</i> , agregar 40 µL de <i>reactivo de derivatización</i> y mezclar. Sellar el recipiente de la muestra con un tapón de goma de silicona y calentar a 70 °C durante 10 minutos. Mientras se calienta la muestra, la mezcla se disuelve completamente. Después de la derivatización, diluir la muestra de prueba con una cantidad adecuada de <i>solución amortiguadora de dilución de la muestra</i> .		
<b>Sistema cromatográfico:</b> Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 436 nm y una columna de 4,6 mm × 250 mm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1 mL por minuto y la		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>temperatura de la columna se mantiene a 40 °C. Programar el sistema del siguiente modo. Equilibrar la columna con 85 % de <i>solución A</i> y 15 % de <i>solución B</i>; durante los siguientes 20 minutos, cambiarla composición de la <i>fase móvil</i> a 60 % de <i>solución A</i> y 40 % de <i>solución B</i>; durante los siguientes 12 minutos, cambiar la composición a 30 % de <i>solución A</i> y 70 % de <i>solución B</i> y mantener durante 2 minutos más.</p>		
<p><b>Procedimiento:</b> Inyectar en el cromatógrafo aproximadamente 0.05 nmol de los aminoácidos-DABS y proceder según se indica en <i>sistema cromatográfico</i>.</p>		
<p><b>•Método 7—Derivatización precolumna con FMOC-Cl</b></p>		
<p>A continuación, se presenta un método de derivatización precolumna con FMOC-Cl.</p>		
<p><b>Preparación de la fase móvil</b></p>		
<p><b>Solución amortiguadora de ácido acético:</b> Transferir 3 mL de ácido acético glacial y 1 mL de trietilamina a un matraz volumétrico de 1 L y diluir a volumen con agua de grado HPLC. Ajustar con hidróxido de sodio hasta un pH de 4.20.</p>		
<p><b>Solución A:</b> Mezcla de <i>solución amortiguadora de ácido acético</i>, metanol y acetonitrilo (50:40:10).</p>		
<p><b>Solución B:</b> Mezcla de acetonitrilo y <i>solución amortiguadora de ácido acético</i> (50:50).</p>		
<p><b>Fase Móvil:</b> Usar mezclas variables de <i>solución A</i> y <i>solución B</i> según se indica en <i>sistema cromatográfico</i>.</p>		
<p><b>Preparación del reactivo de derivatización</b></p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p><b>Solución amortiguadora de borato:</b> Preparar una solución de ácido bórico 1 M y ajustar con hidróxido de sodio hasta un pH de 6.2.</p>		
<p><b>Reactivo FMOC-Cl:</b> Disolver 155 mg de cloroformiato de 9-fluorenilmetilo en 40 mL de acetona y mezclar.</p>		
<p><b>Procedimiento de derivatización de la muestra:</b> Agregar 0.1 mL de <i>solución amortiguadora de borato</i> y 0.5 mL de <i>reactivo FMOC-Cl</i> a 0.4 mL de la muestra de prueba. Después de aproximadamente 40 segundos, extraer la mezcla con 2 mL de pentano y luego extraer una vez más con una nueva porción de pentano. La solución acuosa con los derivados de aminoácidos queda lista para la inyección.</p>		
<p><b>Sistema cromatográfico:</b> Equipar el cromatógrafo de líquidos con un detector fluorométrico ajustado a una longitud de onda de excitación de 260 nm y una longitud de onda de emisión de 313 nm y con una columna de 4.6 mm × 125 mm con empaque de material L1 de 3 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,3 mL por minuto. Programar el sistema del siguiente modo. Equilibrar la columna con <i>solución A</i> y mantener esta composición durante 3 minutos; durante los siguientes 9 minutos, cambiar a 100 % de <i>solución B</i>; durante los siguientes 0.5 minutos, aumentar la velocidad de flujo a 2 mL por minuto y mantenerla hasta que el último aminoácido-FMOC eluya de la columna. El tiempo total de la corrida es de aproximadamente 20 minutos.</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p><b>Procedimiento:</b> Inyectar en el cromatógrafo no menos de 0.01 nmol de cada aminoácido-FMOC en análisis y proceder según se indica en el sistema cromatográfico. El derivado histidina-FMOC por lo general dará una respuesta menor que los demás derivados.</p>		
<p><b>•Método 8—Derivatización precolumna con NBD-F</b></p>		
<p>A continuación, se presenta un método de derivatización precolumna con NBD-F.</p>		
<p><b>Preparación de la fase móvil:</b></p>		
<p><b>Solución A—</b>Solución de citrato de sodio 10 mM y perclorato de sodio 75 mM, ajustada con ácido clorhídrico hasta un pH de 6.2.</p>		
<p><b>Solución B—</b>Mezcla de acetonitrilo y agua (50:50).</p>		
<p><b>Preparación del reactivo de derivatización:</b></p>		
<p><b>Solución amortiguadora de muestra—</b>Solución de ácido bórico 0.1 M ajustada con hidróxido de sodio a un pH de 9.2.</p>		
<p><b>Reactivo de derivatización—</b>Disolver 5 mg de NBD-F en 1.0 mL de alcohol y mezclar.</p>		
<p><b>Procedimiento de derivatización de la muestra:</b> Disolver la muestra de prueba en 20 µL de Solución amortiguadora de muestra, agregar 10 µL de reactivo de derivatización y mezclar. Calentar el recipiente de la muestra a 60 °C durante 5 minutos. Después de la derivatización, diluir la muestra de prueba con 300 µL de la solución A.</p>		
<p><b>Sistema cromatográfico:</b> Equipar el cromatógrafo de líquidos con un detector fluorométrico ajustado a una longitud de onda de excitación de 480 nm y</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>una longitud de onda de emisión de 530 nm y una columna de 4.6 mm × 150 mm con empaque de sílice ODS con un tamaño de partícula de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1.0 mL por minuto y la temperatura de la columna se mantiene a 40 °C. Programar el sistema del siguiente modo. Equilibrar la columna con 94 % de <i>solución A</i> y 6 % de <i>solución B</i>; durante los siguientes 16 minutos, cambiar linealmente la composición a 63 % de <i>solución A</i> y 37 % de <i>solución B</i>; durante los siguientes 5 minutos, cambiar linealmente la composición a 62 % de <i>solución A</i> y 38 % de <i>solución B</i>; durante los siguientes 9 minutos, cambiar linealmente la composición a 100 % de <i>solución B</i> y mantener durante otros 5 minutos; finalmente durante 2 minutos, cambiar linealmente la composición a 94 % de <i>solución A</i> y 6 % de <i>solución B</i> y luego dejar equilibrar la columna antes de la siguiente inyección.</p>		
<p><b>Procedimiento:</b> Inyectar en el cromatógrafo aproximadamente 15 pmol de cada aminoácido-NBD en análisis y proceder según se indica en el <i>sistema cromatográfico</i>.</p>		

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