

Condroitina Sulfato de Sodio de Tiburón

Tipo de Publicación	Boletín de Revisión
Fecha de Publicación	27–ene–2017
Fecha Oficial Aplicable	01–feb–2017
Comité de Expertos	Suplementos Dietéticos No Botánicos
Motivo de la Revisión	Cumplimiento

De conformidad con las Reglas y Procedimientos del Consejo de Expertos 2015-2020, el Comité de Expertos en Suplementos Dietéticos No Botánicos ha revisado la monografía de Condroitina Sulfato de Sodio de Tiburón. El propósito de esta revisión es reducir el límite de $\Delta\text{Di-2,6diS}$ de no menos de 15% a no menos de 8% para incluir productos ya comercializados.

Asimismo, se han realizado cambios editoriales mínimos para actualizar la monografía al estilo *USP* vigente.

El Boletín de Revisión de Condroitina Sulfato de Sodio de Tiburón reemplaza la monografía oficial vigente. El Boletín de Revisión será incorporado en el Segundo Suplemento de USP40–NF35.

Para cualquier pregunta, por favor contactar a Huy Dinh, Enlace Científico Sénior (301-816-8594 o htd@usp.org).

Descargar el Boletín de Revisión de Condroitina Sulfato de Sodio de Tiburón.

Condroitina Sulfato de Sodio de Tiburón

Chondroitin, hydrogen sulfate, sodium salt;
Sulfato sódico de condroitina (tiburón) [9082-07-9].

DEFINICIÓN

Cambio en la redacción:

La Condroitina Sulfato de Sodio de Tiburón es la sal sódica del glicosaminoglicano lineal sulfatado que se obtiene de cartílagos de tiburón usados como alimento para humanos. La Condroitina Sulfato de Sodio de Tiburón está compuesta principalmente por la sal sódica del éster sulfúrico del copolímero de *N*-acetilcondrosamina (2-acetamido-2-desoxi- β -D-galactopiranososa) y ácido D-glucurónico. Estas hexosas están unidas en el polímero en forma alternada mediante uniones β -1,4 y β -1,3. Las unidades de condrosamina en el glicosaminoglicano prevaeciente están monosulfatadas principalmente en la posición 6, con menor frecuencia en la posición 4, presentando una disulfatación en ambas posiciones 4 y 6 con frecuencia aún menor. No menos de 8% (BR 01-feb-2017) de las unidades de ácido D-glucurónico están monosulfatadas en la posición 2. Contiene no menos de 90,0% y no más de 105,0% de condroitina sulfato de sodio, calculado con respecto a la sustancia seca.

[NOTA—La Condroitina Sulfato de Sodio de Tiburón (BR 01-feb-2017) es extremadamente higroscópica una vez seca. Evitar la exposición a la atmósfera y pesar inmediatamente.]

IDENTIFICACIÓN

- **A. ABSORCIÓN EN EL INFRARROJO** (197K)
- **B. IDENTIFICACIÓN—PRUEBAS GENERALES** (191), Sodio
Solución muestra: 0,5 g en 10 mL de agua
Criterios de aceptación: Cumple con los requisitos.

Cambio en la redacción:

- **C. DISACÁRIDOS ESPECÍFICOS:** El cromatograma de la *Solución muestra* digerida enzimáticamente, según se obtiene en la prueba de *Composición de Disacáridos* presenta tres picos principales debidos a los disacáridos 6-sulfato (Δ Di-6S), 4-sulfato (Δ Di-4S) y 2,6-disulfato (Δ Di-2,6diS), correspondientes a los de la *Solución estándar* digerida enzimáticamente, siendo Δ Di-6S el más abundante, seguido de Δ Di-4S, con no menos de 8% (BR 01-feb-2017) correspondiente a Δ Di-2,6diS. Pueden detectarse picos menores adicionales correspondientes a (Δ Di-0S) sin sulfato y con disulfatación en 4 y 6.
- **D. ROTACIÓN ESPECÍFICA:** Cumple con los requisitos en *Pruebas Específicas*.

COMPOSICIÓN

- **CONTENIDO DE CONDROITINA SULFATO DE SODIO**
Soluciones estándar: 1,5; 1,0 y 0,5 mg/mL de ER Condroitina Sulfato de Sodio de Tiburón USP seco en agua
Solución muestra: Transferir 100 mg de Condroitina Sulfato de Sodio de Tiburón secada a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver en 30 mL de agua y diluir con agua a volumen.
Diluyente: Pesar aproximadamente 297 mg de fosfato monobásico de potasio, 492 mg de fosfato dibásico de potasio y 250 mg de polisorbato 80, y transferir a un vaso de precipitados de 1 litro. Disolver en 900 mL de

agua y ajustar con hidróxido de potasio o ácido fosfórico a un pH de $7,0 \pm 0,2$. Diluir con agua hasta 1 litro y mezclar minuciosamente.

Sistema volumétrico

(Ver *Volumetría* (541).)

Modo: Valoración volumétrica con detección fotométrica

Solución volumétrica: 1 mg/mL de cloruro de cetilpiridinio en agua. Desgasificar antes de usar.

Detección del punto final: Turbidimétrica con una sonda fotoeléctrica

Análisis: Transferir 5,0 mL de cada una de las *Soluciones estándar* y de la *Solución muestra* a sendos vasos de valoración, y agregar 25 mL del *Diluyente* a cada uno. Mezclar hasta obtener una lectura estable con la sonda fotoeléctrica ajustada a 420; 550 ó 660 nm. Ajustar el instrumento a cero en modo de absorbancia. Valorar con la *Solución volumétrica* usando la sonda fotoeléctrica para determinar el punto final turbidimétricamente. A partir de una ecuación de regresión lineal, que se calcula usando los volúmenes de la *Solución volumétrica* consumidos en función de las concentraciones de las *Soluciones estándar*, determinar la concentración de condroitina sulfato de sodio en la *Solución muestra*.

Calcular el porcentaje de condroitina sulfato de sodio en la porción de Condroitina Sulfato de Sodio de Tiburón tomada:

$$\text{Resultado} = (C/C_U) \times 100$$

C = concentración de condroitina sulfato de sodio en la alícuota de la *Solución muestra*, obtenida a partir de la ecuación de regresión (mg/mL)

C_U = concentración de Condroitina Sulfato de Sodio de Tiburón en la *Solución muestra* (mg/mL)

Criterios de aceptación: 90,0%–105,0% con respecto a la sustancia seca

Cambio en la redacción:

COMPOSICIÓN DE DISACÁRIDOS

Solución A: Agua ajustada con ácido clorhídrico 0,1 N a un pH de 3,5

Solución B: Cloruro de sodio 1 M ajustada con ácido clorhídrico 0,1 N a un pH de 3,5

Fase móvil: Ver la *Tabla 1*.

Tabla 1

Tiempo (min)	Solución A (%)	Solución B (%)
0,0	100	0
4,0	100	0
45,0	50	50
45,1	100	0

Solución amortiguadora: Tris(hidroximetil)aminometano 50 mM y acetato de sodio 60 mM, ajustada con ácido clorhídrico diluido a un pH de 8,0

Solución estándar: 2,4 mg/mL de ER Condroitina Sulfato de Sodio de Tiburón USP seco en agua

Solución muestra: Transferir aproximadamente 250 mg de Condroitina Sulfato de Sodio de Tiburón secada a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y diluir con agua a volumen. Filtrar para obtener una solución transparente.

2 Condroitina

Blanco: Agua

Solución de condroitinasa ABC: Disolver 1 unidad (U/mg de proteína) de condroitinasa ABC¹ en 1,0 mL ERR (01-jun-2016) de *Solución amortiguadora*. Mezclar minuciosamente.

Solución de aptitud de condroitinasa ABC: Diluir la *Solución estándar* incubada (1 en 10) y medir su absorbancia en función del *Blanco* incubado a 232 nm. La absorbancia es no menos de 8 AU · mL · mg⁻¹ · cm⁻¹.

Sistema cromatográfico
(Ver *Cromatografía* (621), *Aptitud del Sistema*.)

Modo: HPLC

Detector: UV 232 nm

Columna: 4,6 mm × 25 cm; relleno L14 de 5 µm

Velocidad de flujo: 1 mL/min

Volumen de inyección: 20 µL

Aptitud del sistema

Muestra: *Solución estándar* (que se prepara según se indica a continuación en *Análisis*)

[NOTA—Los tiempos de retención relativos para los picos de ΔDi-0S, ΔDi-6S, ΔDi-4S y ΔDi-2,6diS son 0,50; 0,75; 0,80 y 1,0, respectivamente.]

Requisitos de aptitud

Similitud de los cromatogramas: El cromatograma de la *Solución estándar* es similar al cromatograma de referencia provisto con el ER Condroitina Sulfato de Sodio de Tiburón USP.

Resolución: No menos de 2,0 entre los picos de ΔDi-6S y ΔDi-4S

Desviación estándar relativa: No más de 5,0% para los picos de ΔDi-6S, ΔDi-4S o ΔDi-2,6diS

Análisis

Muestras: *Solución estándar*, *Solución muestra* y *Blanco*. En sendos viales, combinar 0,8 mL de la *Solución amortiguadora*, 0,1 mL de la *Solución de condroitinasa ABC* y 0,1 mL ERR (01-jun-2016) de la *Solución estándar*, de la *Solución muestra* y del *Blanco*. Mezclar minuciosamente. Incubar a 37° durante 3 horas. Dejar que cada solución se enfríe a temperatura ambiente y centrifugar antes de inyectar.

Calcular el porcentaje de cada disacárido en la muestra tomada:

$$\text{Resultado} = (r_U / \Sigma r_U) \times 100$$

r_U = área del pico de ΔDi-0S, ΔDi-6S, ΔDi-4S o ΔDi-2,6diS de la *Solución muestra*

Σr_U = suma de las áreas de los picos de ΔDi-0S, ΔDi-6S, ΔDi-4S y ΔDi-2,6diS de la *Solución muestra*

Criterios de aceptación: El porcentaje de área del pico de ΔDi-6S es mayor que el del pico de ΔDi-4S, y el porcentaje de área del pico de ΔDi-2,6diS es el menor de los tres. El porcentaje de área del pico de ΔDi-2,6diS es no menos de 8% (BR 01-feb-2017).

IMPUREZAS

• **RESIDUO DE INCINERACIÓN** (281): 20,0%–30,0% con respecto a la sustancia seca

• **CLORUROS Y SULFATOS** (221), *Cloruros*

Solución estándar: 0,7 mL de ácido clorhídrico 0,020 N

Muestra: 0,1 g

Criterios de aceptación: No más de 0,50%

• **CLORUROS Y SULFATOS** (221), *Sulfatos*

Solución estándar: 0,25 mL de ácido sulfúrico 0,020 N

Solución muestra: Disolver 200 mg en 40 mL de agua. Agregar 10 mL de una solución de cloruro de cetilpiridinio con una concentración de 30 mg/mL y pasar a

través de un filtro. Usar una porción de 25 mL del filtrado.

Criterios de aceptación: No más de 0,24%; la *Solución muestra* no presenta más sulfato que la *Solución estándar*.

• PUREZA ELECTROFORÉTICA

[PRECAUCIÓN—Los voltajes usados en la electroforesis pueden producir fácilmente una electrocución letal. El riesgo se incrementa por el uso de soluciones amortiguadoras acuosas y la posibilidad de trabajar en ambientes húmedos. El equipo, con la posible excepción de la fuente de energía, debe estar contenido en una caja de metal con conexión a tierra o en una caja de material aislante. La caja debe tener un sistema que corte la fuente de energía cuando la caja se abra y que evite la reactivación hasta que se lleve a cabo un reinicio del interruptor. Los cables de alto voltaje que van desde la fuente de energía al aparato deben ser preferiblemente de un tipo en el cual un blindaje de metal trenzado encierra completamente al conductor central aislado y, además, el blindaje debe tener conexión a tierra. La base del aparato debe ser de metal con conexión a tierra o contener un borde de metal con conexión a tierra construido de forma que cualquier fuga de electrólito produzca un cortocircuito que corte la fuente de energía antes de que el electrólito pueda derramarse más allá de la cubierta protectora. Si la fuente de energía contiene condensadores como parte de un circuito de filtro, también debe contener un resistor de derivación para garantizar la descarga de los condensadores antes de que se abra la caja de protección. Como prevención adicional, puede considerarse una barra de cortocircuito que se active al abrir la caja. Dado el riesgo potencial asociado a la electroforesis, el personal de laboratorio debe estar totalmente familiarizado con el equipo de electroforesis antes de usarlo.]

Solución amortiguadora de acetato de bario: Disolver 25,24 g de acetato de bario en 900 mL de agua. Ajustar con ácido acético a un pH de 5,0 y diluir con agua hasta 1000 mL.

Reactivo de tinción: Disolver 1 g de azul de toluidina en 1000 mL de ácido acético 0,1 M.

Solución estándar A: 30 mg/mL de ER Condroitina Sulfato de Sodio de Tiburón USP en agua

Solución estándar B: Diluir 1 mL de *Solución estándar A* con agua hasta 50 mL.

Solución muestra: 30 mg/mL de Condroitina Sulfato de Sodio de Tiburón en agua

Análisis: Llenar las cámaras de un aparato de electroforesis adecuado para separaciones en membranas de acetato de celulosa² (una pequeña cámara submarina para geles o una dedicada a los medios de membrana) con la *Solución amortiguadora de acetato de bario*. Empapar una membrana de acetato de celulosa de 5–6 cm × 12–14 cm en la *Solución amortiguadora de acetato de bario* durante 10 minutos, o hasta que se humedezca uniformemente, luego secar entre dos hojas de papel absorbente. Usando un aplicador³ adecuado para electroforesis, aplicar volúmenes iguales (0,5 µL) de la *Solución muestra*, la *Solución estándar A* y la *Solución estándar B* al lado más brillante de la membrana colocada sobre un soporte de aplicador apropiado o sobre un puente de separación en la cámara. Asegurarse de que ambos extremos de la membrana estén sumergidos a una profundidad de al menos

² Se pueden obtener membranas de acetato de celulosa adecuadas para electroforesis en Malta Chemetron SRL, Milán, Italia; Fluka Chemical Corp., Milwaukee, WI; y Apacor Ltd., Berkshire, Inglaterra (www.apacor.com/products/electrophoresis/cellulose-acetate-membranes).

³ Se pueden obtener aplicadores adecuados en Apacor Ltd., Berkshire, Inglaterra (www.apacor.com/PDF/APA092-ElectrophoresisEquipmentSupplies.pdf) y Helena Laboratories, Beaumont, TX (www.helena.com).

¹ Se puede obtener Chondroitinase ABC de *Proteus vulgaris* en Sigma (www.sigmaldrich.com), N° de Catálogo C3667.

0,5–1,0 cm en las cámaras con solución amortiguadora. Aplicar una corriente constante de 60 voltios (6 mA al principio) durante 2 horas. [NOTA—Llevar a cabo la aplicación de soluciones y voltaje dentro de los 5 minutos, porque un mayor secado del papel absorbente reduce la sensibilidad.]

Colocar la membrana en una bandeja de tinción de plástico y, con el lado de la aplicación hacia abajo, hacer flotar o sumergir con cuidado en el *Reactivo de tinción* durante 5 minutos. Luego, mezclar la solución suavemente durante 1 minuto. Retirar la membrana y decolorar en ácido acético al 5% hasta que el fondo se aclare. Comparar las bandas.

[NOTA—Documentar los resultados tomando una fotografía dentro de los 15 minutos de completada la decoloración.]

Criterios de aceptación: El electroferograma de la *Solución muestra* presenta una banda principal idéntica en posición a la banda de la *Solución estándar A*. La banda de la *Solución estándar B* es claramente visible a una movilidad similar a la de la banda de la *Solución estándar A*. Ninguna banda secundaria en el electroferograma de la *Solución muestra* es de mayor intensidad que la banda de la *Solución estándar B*. Se encuentra no más de 2% de cualquier impureza individual en Condroitina Sulfato de Sodio de Tiburón.

Cambio en la redacción:

• LÍMITE DE PROTEÍNA

Solución A: 20 mg/mL de tartrato de sodio dihidrato
Solución B: 10 mg/mL de sulfato cúprico

Solución C: 20 mg/mL de carbonato de sodio anhidro en hidróxido de sodio 0,1 M

Reactivo de Folin-Ciocalteu diluido: Diluir Folin-Ciocalteu para fenoles SR con agua (1:5). Preparar inmediatamente antes de usar.

Reactivo tartrato cúprico alcalino: Mezclar 1 mL de *Solución A* y de *Solución B*, y agregar lentamente 100 mL de *Solución C* a la mezcla, mezclando. Usar dentro de las 24 horas y desechar después de dicho plazo.

Solución estándar: 36 µg/mL de estándar certificado de albúmina sérica bovina en agua

Solución muestra: Transferir una porción de Condroitina Sulfato de Sodio de Tiburón, equivalente a 60 mg de la materia seca, a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y diluir con agua a volumen.

Condiciones instrumentales

(Ver *Espectroscopía Ultravioleta-Visible* (857).) • ERR (01-jun-2016)

Longitud de onda analítica: 750 nm

Blanco: Agua

Análisis

Muestras: *Solución estándar*, *Solución muestra* y *Blanco*
Agregar 2,0 mL del *Reactivo tartrato cúprico alcalino* recientemente preparado a tres tubos de ensayo que contengan 2,0 mL de la *Solución estándar*, 2,0 mL de la *Solución muestra* o 2,0 mL del *Blanco* cada uno. Después de 10 minutos, agregar 1,0 mL del *Reactivo de Folin-Ciocalteu diluido* a cada tubo de ensayo y mezclar inmediatamente y de manera vigorosa. Des-

pués de 30 minutos, medir la absorbancia de la *Solución estándar* y la *Solución muestra* contra el *Blanco*.

Criterios de aceptación: No más de 6,0% con respecto a la sustancia seca; la absorbancia de la *Solución muestra* es no mayor que la absorbancia de la *Solución estándar*.

CONTAMINANTES

• IMPUREZAS ELEMENTALES—PROCEDIMIENTOS (233)

Criterios de aceptación

Arsénico: No más de 2,0 µg/g

Cadmio: No más de 1,0 µg/g

Plomo: No más de 1,0 µg/g

Mercurio: No más de 1,0 µg/g

• **PRUEBAS DE RECuento MICROBIANO (2021):** El recuento total bacteriano no excede de 10³ ufc/g, y el recuento total combinado de hongos filamentosos y levaduras no excede de 10² ufc/g.

• **AUSENCIA DE MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS (2022):** Cumple los requisitos de las pruebas para determinar la ausencia de *Salmonella* spp. y *Escherichia coli*.

PRUEBAS ESPECÍFICAS

Cambio en la redacción:

• TRANSPARENCIA Y COLOR DE LA SOLUCIÓN

Solución muestra: Transferir 2,5 g de Condroitina Sulfato de Sodio de Tiburón a un matraz volumétrico de 50 mL. Disolver y diluir con agua exenta de dióxido de carbono a volumen, y observar inmediatamente.

Condiciones instrumentales

(Ver *Espectroscopía Ultravioleta-Visible* (857).) • ERR (01-jun-2016)

Longitud de onda analítica: 420 nm

Celda: 1 cm

Blanco: Agua exenta de dióxido de carbono

Análisis: Medir la absorbancia de la *Solución muestra*.

Criterios de aceptación: No más de 0,35

• ROTACIÓN ÓPTICA (781S), Rotación Específica

Solución muestra: 30 mg/mL en agua

Criterios de aceptación: –12,0° a –23,0°

• PH (791)

Solución muestra: 10 mg/mL

Criterios de aceptación: 5,5–7,5

• PÉRDIDA POR SECADO (731)

Análisis: Secar una muestra a 105° durante 4 horas. [NOTA—La Condroitina Sulfato de Sodio de Tiburón es extremadamente higroscópica una vez seca. Evitar la exposición a la atmósfera y pesar inmediatamente.]

Criterios de aceptación: No más de 12,0%

REQUISITOS ADICIONALES

• **ENVASADO Y ALMACENAMIENTO:** Conservar en envases impermeables.

• **ETIQUETADO:** Etiquetar indicando la fuente de la que se obtuvo el artículo.

• ESTÁNDARES DE REFERENCIA USP (11)

ER Condroitina Sulfato de Sodio de Tiburón USP