**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Триптофан** |  | **ФС** |
| **Триптофан** |  |  |
| **Tryptophanum** |  | **Взамен ВФС 42-594-92** |

|  |
| --- |
|  |
| (2*S*)-2-Амино-3-(1*H*-индол-3-ил)пропановая кислота  |
|  |
| C11H12N2O2 |  М.м. 204,23  |

Субстанция представляет собой продукт ферментации или белкового гидролиза.

Cодержит не менее 98,5 % и не более 101,0 % триптофана C11H12N2O2 в пересчёте на сухое вещество.

**Описание.** Белый или почти белый кристаллический или аморфный порошок.

**Растворимость.** Умеренно растворим в воде, мало растворим в спирте 96 %. Растворяется в разведенных растворах минеральных кислот и щелочей.

**Подлинность**

*1.**ИК-спектрометрия* (ОФС «Спектрометрия в инфракрасной области»).Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области от 4000 до 400 см-1 по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца триптофана.

 *2. Тонкослойная хроматография* (ОФС «Тонкослойная хроматография»).

*Пластинка.* ТСХ пластинка со слоем силикагеля.

*Растворитель.* Уксусная кислота ледяная—вода 50:50.

*Подвижная фаза (ПФ).* Уксусная кислота ледяная—вода—бутанол 20:20:60.

*Испытуемый раствор.*В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 10 мг субстанции, растворяют в растворителе и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Раствор стандартного образца триптофана.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 10 мг стандартного образца триптофана, растворяют в растворителе и доводят объём раствора растворителем до метки.

На линию старта пластинки наносят по 5 мкл испытуемого раствора (1 мкг) и раствора стандартного образца триптофана (1 мкг). Пластинку с нанесёнными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру с ПФ и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт ПФ пройдет около 75 % длины пластинки от линии старта, её вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, обрабатывают нингидрина раствором 0,2 %, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 105 °С в течение 15 мин и просматривают в дневном свете.

Основная зона адсорбции на хроматограмме испытуемого раствора по положению, интенсивности окраски и величине должна соответствовать основной зоне адсорбции на хроматограмме раствора стандартного образца триптофана.

*3. Качественная реакция.* Растворяют 20 мг субстанции в 10 мл воды, прибавляют 5 мл диметиламинобензальдегида раствора и 2 мл хлористоводородной кислоты 25 %, нагревают на водяной бане; должно появиться фиолетово-голубое окрашивание.

**Удельное вращение.** От -33,0 до -30,0 в пересчете на сухое вещество (ОФС «Поляриметрия»).

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 0,25 г субстанции, растворяют в воде, при необходимости нагревая на водяной бане, и доводят объём раствора водой до метки.

**Прозрачность раствора.** Раствор субстанции 1 % в хлористоводородной кислоты растворе 1 М должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

**Цветность раствора.** Раствор, полученный в испытании «Прозрачность раствора», должен выдерживать сравнение с эталоном BY6 (ОФС «Степень окраски жидкостей», метод 2).

**рН.** От 5,5 до 7,0 (раствор, полученный в испытании «Удельное вращение», ОФС «Ионометрия», метод 3).

**Родственные примеси**

***1. Нингидрин чувствительные примеси.*** Определение проводят методом ионообменной хроматографии с пост-колоночной дериватизацией с нингидрином (ОФС «Аминокислотный анализ», анализ по методу 1).

*Растворитель.* Хлористоводородная кислота разведённая 0,037 %.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают около 30 мг (точная навеска) субстанции, растворяют в растворителе и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Раствор L-пролина.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают около 10 мг (точная навеска) L-пролина, растворяют в растворителе и доводят объём раствора растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 250 мл помещают 3,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Раствор сравнения.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,0 мл испытуемого раствора и доводят объём раствора растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 2,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 5 мг L-изолейцина и 5 мг L-лейцина, растворяют в растворителе и доводят объём раствора растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 6,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Холостой раствор.* Растворитель.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Детектор | спектрофотометрический, 440 и 570 нм. |

Остальные условия устанавливают в соответствии с инструкцией по эксплуатации аминокислотного анализатора.

Хроматографируют эквивалентные объёмы холостого раствора, раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы, раствора L-пролина, раствора сравнения и испытуемого раствора.

*Пригодность хроматографической системы*. На хроматограмме раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы *разрешение (RS)* между пиками L-изолейцина и L-лейцина должно быть не менее 1,5.

Содержание любой примеси, обнаруживаемой при длине волны 570 нм, в субстанции в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S\_{1}∙50∙1∙2∙100}{S\_{0}∙50∙100∙10}=\frac{S\_{1}}{S\_{0}∙5},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | − | площадь пика примеси на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | − | площадь пика триптофана на хроматограмме раствора сравнения. |

Содержание любой примеси, обнаруживаемой при длине волны 440 нм, в субстанции в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙P∙50∙3}{S\_{0}∙a\_{1}∙100∙250}=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙P∙0,006}{S\_{0}∙a\_{1}},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | − | площадь пика примеси на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | − | площадь пика L-пролина на хроматограмме раствора L-пролина; |
|  | *a*1 | – | навеска субстанции, мг; |
|  | *a*0 | − | навеска L-пролина, мг; |
|  | *P* | − | содержание основного вещества в L-пролине, %.  |

Если примесь превышает порог игнорирования при обоих длинах волн, ее рассчитывают при длине волны 570 нм.

*Допустимое содержание примесей:*

- любая примесь − не более 0,2 %;

- сумма примесей − не более 0,5 %;

Не учитывают пики менее 0,05 %.

***2. Примесь А и другие примеси.*** Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

Все растворы используют сразу после приготовления.

*Буферный раствор.* Растворяют 3,9 г калия дигидрофосфата в 1000 мл воды, прибавляют 700 мл фосфорной кислоты разведённой 0,25 % и доводят значение рН до 2,3±0,1 фосфорной кислотой разведённой 0,25 %.

*Подвижная фаза А (ПФА).* Ацетонитрил—буферный раствор 115:885.

*Подвижная фаза Б (ПФБ).* Ацетонитрил—буферный раствор 350:650.

*Растворитель.* Ацетонитрил—вода 10:90.

*Раствор внутреннего стандарта.*В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают около 10,0 мг *N*-ацетилтриптофана, растворяют в растворителе и доводят объём раствора растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Испытуемый раствор А.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 0,1 г субстанции, растворяют в растворителе и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Испытуемый раствор Б.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 0,1 г субстанции, растворяют в растворе внутреннего стандарта и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор стандартного образца примеси А (А).* Содержимое флакона стандартного образца примеси А растворяют в 1,0 мл растворителя. В мерную колбу вместимостью 5 мл помещают 0,5 мл полученного раствора и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Раствор стандартного образца примеси А (Б).* Содержимое флакона стандартного образца примеси А растворяют в 1,0 мл раствора внутреннего стандарта.

Примечание

Примесь А (этан-1,1-дилбистриптофан): (2*S*)-2-амино-3-(1-[1-{3-((2*S*)-2-амино-2-карбоксиэтил)индол-1-ил}этил]индол-3-ил)пропановая кислота, CAS 132685-02-0.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 250 × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | 40 °С; |
| Скорость потока | 0,7 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 220 нм; |
| Объём пробы | 20 мкл.  |

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФА, % | ПФБ, % |
| 0 – 10 | 100 | 0 |
| 10 – 45 | 100 → 0 | 0 → 100 |
| 45 – 65 | 0 | 100 |

Хроматографируют раствор стандартного образца примеси А (А), раствор стандартного образца примеси А (Б), испытуемый раствор А и испытуемый раствор Б.

*Относительное время удерживания соединений.* Триптофан – 1 (около 8 мин); *N*-ацетилтриптофан – около 3,6; примесь А – около 4,3.

*Пригодность хроматографической системы*

На хроматограмме раствора стандартного образца примеси А (А) *отношение сигнал/шум (S/N)* для пика триптофана должно быть не менее 15.

На хроматограмме раствора стандартного образца примеси А (Б):

- *разрешение (RS)* между пиками *N*-ацетилтриптофана и примеси А должно быть не менее 8,0;

- *фактор асимметрии пика (AS)* примеси А должен быть не более 3,5.

На хроматограмме испытуемого раствора А не должно быть пика *N*-ацетилтриптофана, в противном случае необходимо скорректировать площадь пика *N*-ацетилтриптофана на хроматограмме испытуемого раствора Б.

Содержание примеси А в субстанции в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙P∙10∙0,5}{S\_{0}∙a\_{1}∙1∙5}=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙P}{S\_{0}∙a\_{1}},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | − | площадь пика примеси А на хроматограмме испытуемого раствора (Б); |
|  | *S*0 | − | площадь пика примеси А на хроматограмме раствора стандартного образца примеси А (А); |
|  | *a*1 | – | навеска субстанции, мг; |
|  | *a*0 | − | содержание стандартного образца примеси А в флаконе, мг; |
|  | *P* | − | содержание примеси А в стандартном образце примеси А, %.  |

Поправочный коэффициент (*k*) вычисляют по формуле:

$$k=\frac{S\_{1}∙C\_{0}}{S\_{0}∙C\_{1}},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | − | площадь пика *N*-ацетилтриптофана на хроматограмме испытуемого раствора (Б); |
|  | *S*0 | − | площадь пика триптофана на хроматограмме испытуемого раствора (Б); |
|  | *С*1 | – | концентрация *N*-ацетилтриптофана на хроматограмме испытуемого раствора (Б), мг/мл; |
|  | *С*0 | − | концентрация триптофана на хроматограмме испытуемого раствора (Б), мг/мл. |

Суммарное содержание примесей, элюирующихся до основного пика, и суммарное содержание примесей, элюирующихся в интервале после основного пика и до 1,8-кратного времени удерживания пика *N*-ацетилтриптофана, в субстанции в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{∑S\_{i}∙k∙a\_{0}∙P∙10∙1}{S\_{0}∙a\_{1}∙100∙50}=\frac{∑S\_{i}∙k∙a\_{0}∙P}{S\_{0}∙a\_{1}∙500},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *∑Si* | − | сумма площадей пиков соответствующих примесей на хроматограмме испытуемого раствора (Б); |
|  | *S*0 | − | площадь пика *N*-ацетилтриптофана на хроматограмме раствора стандартного образца примеси А (Б); |
|  | *a*1 | – | навеска субстанции, мг; |
|  | *a*0 | − | навеска *N*-ацетилтриптофана, мг; |
|  | *P* | − | содержание основного вещества в *N*-ацетилтриптофане, %; |
|  | *k* | − | поправочный коэффициент. |

*Допустимое содержание примесей:*

- примесь А − не более 0,001 %;

- сумма примесей, элюирующихся до основного пика − не более 0,01 %;

- сумма примесей, элюирующихся в интервале после основного пика и до 1,8-кратного времени удерживания пика *N*-ацетилтриптофана − не более 0,03 %.

Не учитывают пик *N*-ацетилтриптофана и пики, площадь которых составляет менее 0,02 площади пика *N*-ацетилтриптофана на хроматограмме раствора стандартного образца примеси А (Б) (менее 0,0004 %).

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 0,5 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Для определения используют около 1 г (точная навеска) субстанции.

**Аммоний.** Определение проводят методом методом ионообменной хроматографии с пост-колоночной дериватизацией с нингидрином в условиях испытания «Родственные примеси» со следующими изменения.

*Раствор аммония хлорида.* Около 0,741 г (точная навеска) аммония хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 10,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора водой до метки. Раствор используют сразу после приготовления.

*Стандартный раствор.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 6,0 мл раствора аммония хлорида и доводят объём раствора растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Детектор | спектрофотометрический, 570 нм. |

Хроматографируют эквивалентные объёмы холостого раствора, стандартного и испытуемого растворов.

*Допустимое содержание примесей.* На хроматограмме испытуемого раствора площадь пика аммония не должна превышать площадь основного пика на хроматограмме стандартного раствора (не более 0,02 %).

**Железо.** Не более 0,002 % (ОФС «Железо», метод 2).

*Испытуемый раствор.* Около 0,5 г (точная навеска) субстанции помещают в делительную воронку, растворяют в 10 мл хлористоводородной кислоты разведенной 7,3 %, экстрагируют тремя порциями метилизобутилкетона по 10 мл, каждый раз встряхивая в течение 3 мин, объединяют органические извлечения, прибавляют 10 мл воды и встряхивают в течение 3 мин. Используют водный слой.

**Сульфаты.** Не более 0,03 % (ОФС «Сульфаты», метод 1). Для определения используют 15 мл испытуемого раствора и 15 мл стандартного раствора сульфат-иона (10 мкг/мл).

*Испытуемый раствор.* Растворяют 0,5 г субстанции в смеси хлористоводородная кислота разведённая 7,3 %—вода 5:25 и доводят объем раствора тем же растворителем до 15 мл.

**Хлориды.** Не более0,02 % (ОФС «Хлориды»).

*Испытуемый раствор.* Растворяют 0,25 г субстанции в 3 мл азотной кислоте разведённой 12,5 % и доводят объем раствора водой до 15 мл.

**Сульфатная зола.** Не более 0,1 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 1 г (точная навеска) субстанции.

**Тяжелые металлы.** Не более 0,001 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Тяжёлые металлы», метод 1, в зольном остатке, полученном после сжигания 1 г субстанции, с использованием эталонного раствора 1.

**Остаточные органические растворители.** В соответствии с ОФС «Остаточные органические растворители».

**Микробиологическая чистота.** В соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

**Количественное определение.** Определение проводят методом титриметрии.

Около 0,15 г (точная навеска) субстанции растворяют в 3 мл муравьиной кислоты безводной, прибавляют 50 мл уксусной кислоты безводной и титруют 0,1 Мраствором хлорной кислоты. Конечную точку титрования определяют потенциометрически (ОФС «Потенциометрическое титрование»).

1 мл 0,1М раствора хлорной кислоты соответствует 20,42 мг триптофана C11H12N2O2.

**Хранение.** В защищённом от света месте.