**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
| ФС.0.0.0000 |
| **ТРИПТОФАН** |
| *Tryptophanum* |
| Тryptophan |
|  |
| C11H12N2O2 | *M*r 204,2  |
| [73-22-3] |  |

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

(2*S*)-2-Амино-3-(1*H*-индол-3-ил)пропановая кислота.

L-Триптофан.

Субстанция, получаемая путём ферментации или белкового гидролиза.

*Содержание*: от 98,5 % до 101,0 % триптофана C11H12N2O2 в пересчёте на сухое вещество.

СВОЙСТВА

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

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

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

*Первая идентификация:* А, Б.

*Вторая идентификация:* A, В, Г.

А. **Удельное вращение** (см. раздел *Испытания*).

Б. **ИК-спектрометрия**(*ОФС «Спектрометрия в средней инфракрасной области»*).

*Образец сравнения*: фармакопейный стандартный образец *триптофана*.

*Требование*: инфракрасный спектр поглощения триптофана должен соответствовать спектру фармакопейного стандартного образца триптофана.

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

*Смесь растворителей*: *уксусная кислота ледяная – вода* (50:50 *об/об)*.

*Испытуемый раствор.* 10 мг испытуемого образца растворяют в смеси растворителей и доводят объём раствора той же смесью растворителей до 50 мл.

*Раствор сравнения*. 10 мг фармакопейного стандартного образца триптофана растворяют в смеси растворителей и доводят объём раствора той же смесью растворителей до 50 мл.

*Условия хроматографирования:*

- *ТСХ пластинка со слоем силикагеля;*

- *подвижная фаза: Уксусная кислота ледяная—вода—бутанол* (20:20:60 *об/об/об*);

*- наносимый объём пробы*: 5 мкл;

- *высушивание*: на воздухе;

- *детектирование*: опрыскивание *нингидрина раствором 0,2 %*, выдерживание в сушильном шкафу при температуре 105 °С в течение 15 мин.

*Требования*: на хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться основная зона адсорбции на уровне основной зоны адсорбции на хроматограмме раствора сравнения, соответствующая ей по величине и окраске.

Г. **Качественная реакция**

20 мг испытуемого образца растворяют в 10 мл *воды*, прибавляют 5 мл *диметиламинобензальдегида раствора* и 2 мл 250 г/л *хлористоводородной кислоты*,нагревают на водяной бане; должно появиться фиолетово-синее окрашивание.

ИСПЫТАНИЯ

**Прозрачность раствора** (*ОФС «Прозрачность и степень опалесценции (мутности) жидкостей»*).

0,1 г испытуемого образца растворяют в *1 М хлористоводородной кислоты растворе* и доводят объём раствора тем же растворителем до 10 мл. Полученный раствор должен быть прозрачным.

**Цветность раствора** (*ОФС «Степень окраски жидкостей», метод 2*)**.** Окраска раствора, полученного в испытании «Прозрачность раствора» не должна быть интенсивнее окраски раствора сравнения BY6.

**рН** (*ОФС «Ионометрия», метод 3*). От 5,5 до 7,0.

1,0 г испытуемого образца растворяют в *воде,* и доводят объём раствора тем же растворителем до 100 мл.

**Удельное оптическое вращение (***ОФС «Оптическое вращение»***).**
От –33,0 до –30,0 в пересчёте на сухое вещество.

0,25 г испытуемого образца растворяют в *воде*, при необходимости нагревая на водяной бане, и доводят объём раствора тем же растворителем до 25,0 мл.

**Родственные примеси**

***1. Нингидрин-положительные примеси*.** Определение проводят в соответствии с *ОФС* *«Аминокислотный анализ»* *(метод 1)*.

Содержание каждой аминокислоты выражают в молях. Относительную долю аминокислот рассчитывают, принимая 1/6 часть от суммы количества молей глутаминовой кислоты, гистидина, тирозина, лейцина, аргинина и пролина, равной 1.

*Требование*: полученные значения должны находиться в следующих пределах: глутаминовая кислота, гистидин, тирозин, лейцин, аргинин и пролин – от 0,9 до 1,1;серин – от 1,6 до 2,2; других аминокислот – следовые количества, за исключением триптофана.

Концентрации испытуемого раствора и растворов сравнения могут быть изменены в зависимости от чувствительности используемого оборудования. Концентрации всех растворов корректируются таким образом, чтобы выполнялись требования пригодности системы, как описано в *ОФС «Хроматография»,* с условием сохранения соотношения концентраций между всеми растворами.

*Раствор А*: *хлористоводородная кислота разведённая 0,037 %* или буфер для подготовки проб, подходящий для используемого аппарата.

*Испытуемый раствор*. 30,0 мг испытуемого образца растворяют в растворе А и доводят объём раствора раствором А до 50,0 мл.

*Раствор сравнения (а)*. 1,0 мл испытуемого раствора доводят до объёма 100,0 мл раствором А. 2,0 мл полученного раствора доводят раствором А до объёма 10,0 мл.

*Раствор сравнения (б)*. 30,0 мг *L-пролина* растворяют в растворе А и доводят раствором А до объёма 100,0 мл. 1,0 мл полученного раствора доводят раствором А до объёма 250,0 мл.

*Раствор сравнения (в)*. 6,0 мл аммония стандартного раствора 100 мкг/мл доводят раствором А до объёма 50,0 мл. 1,0 мл полученного раствора доводят раствором А до объёма 100,0 мл.

*Раствор сравнения (г)*. 30 мг *L-**изолейцина* и 30 мг *L-лейцина* растворяют в растворе А и доводят объём раствора раствором А до 50,0 мл. 1,0 мл полученного раствора доводят раствором А до объёма 200,0 мл.

*Контрольный раствор*: раствор А.

Вводят подходящие равные количества испытуемого, раствора сравнения и контрольного раствора в анализатор аминокислот. Запускают программу, подходящую для определения физиологических аминокислот.

*Пригодность системы*: раствор сравнения (г):

- *разрешение (RS)*: не менее 1,5 между пиками изолейцина и лейцина.

Содержаниелюбой нингидрин-положительной примеси, зарегистрированной при длине волны 570 нм, в субстанции в процентах ($X$) вычисляют по формуле:

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

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | $$S\_{1}$$ | – | площадь пика любой другой примеси на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | $$S\_{0}$$ | – | площадь основного пика на хроматограмме раствора сравнения (а). |

Содержание любой нингидрин-положительной примеси, зарегистрированный при длине волны 440 нм, в субстанции в процентах ($X$) вычисляют по формуле:

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

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | $$S\_{1}$$ | – | площадь пика любой примеси на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | $$S\_{0}$$ | – | площадь пика пролина на хроматограмме раствора сравнения (б); |
|  | $$a\_{1}$$ | – | навеска испытуемого образца, мг; |
|  | $$a\_{0}$$ | – | навеска L-пролина, взятая для приготовления раствора сравнения (б), мг; |
|  | $$P$$ | – | содержание основного вещества в L-пролине, %. |

Если примесь регистрируется выше неучитываемого предела как при 570 нм, так и при 440 нм, для количественного расчёта используют результат, полученный при 570 нм.

*Пределы содержания примесей:*

- *любая нингидрин-положительная примесь:* не более 0,2 %;

- *сумма примесей* − не более 0,5 %;

- *порог информирования*: 0,05 %.

Пределы идентификации родственных примесей в фармацевтических субстанциях, указанные в таблице 1 *ОФС «Фармацевтические субстанции»*, не применяются.

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

*Все растворы готовят непосредственно перед использованием.*

*Смесь растворителей*: *ацетонитрил – вода* (10:90 *об*/*об*).

*Буферный раствор.* Растворяют 3,9 г *калия дигидрофосфата* в 1000 мл воды, прибавляют 700 мл 2,9 г/л *фосфорной кислоты концентрированной* и доводят значение рН до 2,3 *фосфорной кислотой концентрированной*.

*Раствор внутреннего стандарта.* 10,0 мг N-ацетилтриптофана растворяют в смеси растворителей и доводят объём раствора той же смесью растворителей до 100,0 мл. 2,0 мл полученного раствора доводят той же смесью растворителей до объёма 100,0 мл.

*Испытуемый раствор (а)*. 0,10 г испытуемого образца растворяют в смеси растворителей и доводят объём раствора той же смесью растворителей до 10,0 мл.

*Испытуемый раствор* *(б)*. 0,10 г испытуемого образца растворяют в растворе внутреннего стандарта и доводят объём раствора тем же раствором до 10,0 мл.

*Раствор сравнения (а)*. Содержимое флакона фармакопейного стандартного образца 1,1'-этилиденбистриптофана (*примесь А*) растворяют в смеси растворителей и доводят объём раствора той же смесью растворителей до 1,0 мл.

*Раствор сравнения (б)*. Содержимое флакона фармакопейного стандартного образца 1,1'-этилиденбистриптофана (*примесь А*) растворяют в растворе внутреннего стандарта и доводят объём раствора тем же раствором до 1,0 мл.

*Раствор сравнения (в)*. 0,5 мл раствора сравнения (а) разводят смесью растворителей и доводят объём раствора той же смесью растворителей до 5,0 мл.

Примечание

Примесь A (этан-1,1-диилбистриптофан): 3,3′-[этан-1,1-диилбис(1*H*-индол-1,3-диил)]бис[(2*S*)-2-аминопропановая кислота].

*Условия хроматографирования*:

- *колонка*: длиной 0,25 м и внутренним диаметром 4,6 мм; заполненная *силикагелем октадецилсилильным для хроматографии* с размером частиц 5 мкм;

- *температура колонки*: 40 °С;

- *подвижная фаза А*: *ацетонитрил – буферный раствор* (115:885 *об/об*);

- *подвижная фаза Б*: *ацетонитрил – буферный раствор* (350:650 *об/об*).

- *режим градиентного элюирования*:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Время (мин)** | **Подвижная фаза А (% *об/об*)** | **Подвижная фаза Б (% *об/об*)** |
| 0–10 | 100 | 0 |
| 10–45 | 100 → 0 | 0 → 100 |
| 45–65 | 0 | 100 |

- *скорость подвижной фазы*: 0,7 мл/мин;

- *детектор*: спектрофотометрический, длина волны 220 нм;

- *вводимый объём пробы*: по 20 мкл испытуемого раствора (а), испытуемого раствора (б), раствора сравнения (б) и раствор сравнения (в).

*Время удерживания.* Триптофан – около 8 мин; *N*-ацетилтриптофан – около 29 мин; примесь А – около 34 мин.

*Пригодность хроматографической системы:*

- *разрешение*: не менее 8,0 между пиками *N*-ацетилтриптофана и примеси А на хроматограмме раствора сравнения (б). При необходимости регулируют временную программу для градиента элюирования (увеличение продолжительности элюирования подвижной фазой А приводит к увеличению времени удерживания и лучшему разрешению;

- *отношение «сигнал*/*шум»*: не менее 15 для основного пика на хроматограмме раствора сравнения (в);

- *коэффициент асимметрии*: не более 3,5 для пика примеси А на хроматограмме раствора сравнения (б);

- на хроматограмме испытуемого раствора (а) не должно быть пика с таким же временем удерживания, как у *N* -ацетилтриптофана (в этом случае корректируют площадь пика *N* -ацетилтриптофана).

*Пределы содержания примесей:* испытуемый раствор (б):

- примесь А: не более 0,001 % (10 ppm);

- 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 % (300 ppm);

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

**Остаточные органические растворители (***ОФС «Остаточные органические растворители»)***.**

**Хлориды** (*ОФС «Хлориды»*).Не более200 ppm.

0,25 г испытуемого образца растворяют в 3 мл *азотной кислоты разведённой 12,5 %* и доводят объём раствора *водой* до 15 мл. При проведении испытания азотную кислоту к испытуемому раствору не прибавляют.

**Сульфаты** (*ОФС «Сульфаты», метод 1*). Не более 300 ppm.

0,5 г испытуемого образца растворяют в смеси *хлористоводородная кислота разведённая 7,3 % – вода* 5:25 и доводят объём раствора тем же растворителем до 15 мл.

**Железо** (*ОФС «Железо», метод 2*). Не более 20 ppm.

0,50 г испытуемого образца помещают в делительную воронку, растворяют в 10 мл *хлористоводородной кислоты разведённой 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.

**Аммоний**

Аминокислотный анализ проводят в соответствии с требованиями *ОФС «Аминокислотный анализ», метод 1* в условиях, описанных в испытании на *Нингидрин-положительные вещества* со следующими изменениями.

*Ввод проб*: испытуемый раствор, раствор сравнения (в) и контрольный раствор.

*Требование:*

- *аммоний при длине волны 570 нм*: на хроматограмме испытуемого раствора площадь пика аммония не должна превышать площадь основного пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,02 %).

**Потеря в массе при высушивании** (*ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1*)**.** Не более 0,5 %.

1,000 г испытуемого образца высушивают в сушильном шкафу при температуре 105 °С.

**Сульфатная зола** (*ОФС «Сульфатная зола» метод 1*). Не более 0,1 %.

Определение проводят с использованием 1,0 г испытуемого образца.

**Микробиологическая чистота**. Испытуемый образец должен выдерживать требования испытания на микробиологическую чистоту.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Титриметрия *(ОФС «Титриметрия (титриметрические методы анализа)»).*

0,150 г испытуемого образца растворяют в 3 мл *муравьиной кислоты безводной*, прибавляют 50 мл *уксусной кислоты безводной* и титруют *0,1 М раствором хлорной кислоты*. Конечную точку титрования определяют потенциометрически (*ОФС «Потенциометрическое титрование»*).

Параллельно проводят контрольный опыт.

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

ХРАНЕНИЕ

В защищённом от света месте.