**Эстрадиола гемигидрат ФС**

**Эстрадиол**

**Estradiolum hemihydricum Вводится впервые**

Эстра-1,3,5(10)-триен-3,17β-диола гемигидрат



|  |  |
| --- | --- |
| C18H24O2 · 1/2 H2O | М.м. 281,39 |

Cодержит не менее 97,0 % и не более 103,0 % эстрадиола гемигидрата C18H24O2 · 1/2 H2O в пересчете на сухое вещество.

**Описание.** Белый или почти белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы.

**Растворимость**. Растворим в ацетоне, умеренно растворим в спирте 96 %, мало растворим в метиленхлориде, практически нерастворим в воде.

**Подлинность**

*1. ИК-спектр.* 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 эстрадиола гемигидрата.

*2. Тонкослойная хроматография*

*Пластинка.* ТСХ пластинка со слоем силикагеля.

*Подвижная фаза (ПФ*). Спирт 96 % – толуол 20:80.

*Испытуемый раствор*. 50 мг субстанции растворяют в 50 мл метанола.

*Раствор стандартного образца эстрадиола гемигидрата.* 50 мг стандартного образца эстрадиола гемигидрата растворяют в 50 мл метанола.

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы*. 25 мг стандартного образца этинилэстрадиола растворяют в 25 мл раствора стандартного образца эстрадиола гемигидрата.

На линию старта пластинки наносят по 5 мкл испытуемого раствора, раствора стандартного образца эстрадиола гемигидрата и раствора для проверки пригодности хроматографической системы. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру с ПФ и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт ПФ пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 – 105 °С в течение 10 мин, опрыскивают горячую пластинку спиртовым раствором серной кислоты 36,6 %, повторно выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 – 105 °С в течение 10 мин, охлаждают до комнатной температуры и просматривают при дневном свете и в УФ-свете при длине волны 365 нм.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы должны наблюдаться две зоны адсорбции, которые могут быть не полностью разделены.

Основная зона адсорбции на хроматограмме испытуемого раствора по положению, интенсивности окраски при дневном свете, флуоресценции в УФ-излучении и величине должна соответствовать основной зоне адсорбции на хроматограмме раствора стандартного образца эстрадиола гемигидрата.

*3. Качественная реакция*. К 1 мг субстанции прибавляют 0,5 мл свежеприготовленного раствора 0,5 % сульфомолибденового реактива. Должно появиться голубое окрашивание, обладающее в ультрафиолетовом свете при 365 нм интенсивной зелёной флуоресценцией. Прибавляют 1 мл концентрированной серной кислоты и 9 мл воды. Окраска должна перейти в розовую с желтоватой флуоресценцией.

**Температура плавления.** От 175 до 180 °С (ОФС «Температура плавления», метод 1, без предварительного подсушивания).

**Удельное вращение**. От +76,0 до +83,0 в пересчёте на безводное вещество (1,0 % раствор субстанции в спирте 96 %, ОФС «Поляриметрия»).

**Родственные примеси.** Определение проводят методом ВЭЖХ.

*Подвижная фаза (ПФ)*. Метанол – ацетонитрил – вода 50:400:400. Выдерживают 10 мин и доводят объём водой до 1 л.

*Испытуемый раствор*. 25 мг субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 10,0 мл ацетонитрила доводят объём раствора метанолом до метки.

*Раствор сравнения А.* 1,0 мл испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объём раствора ПФ до метки. 1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводят объём раствора ПФ до метки.

*Раствор сравнения Б.* 5 мг стандартного образца эстрадиола для идентификации пиков, содержащего примеси А, В и С на уровне около 0,5 %, растворяют в 2 мл ацетонитрила и доводят объём раствора метанолом до 5,0 мл.

*Раствор сравнения В.* Смешивают равные объёмы раствора испытуемой субстанции в метаноле 1 мг/мл и раствора 2,3-дихлоро-5,6-дицианобензохинона в метаноле 1 мг/мл. Выдерживают 30 мин.

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.* 2 мг 17α-эстрадиола растворяют в 5,0 мл ацетонитрила. 2,0 мл полученного раствора смешивают с 1,0 мл испытуемого раствора и доводят ПФ до 5,0 мл.

Примечание.

Примесь А:Эстрон,3-Гидроксиэстра-1,3,5(10)-триен-17-он, CAS 53-16-7;

примесь В: 17α-Эстрадиол,Эстра-1,3,5(10)-триен-3,17β-диол, CAS 57-91-0;

примесь C: 4-Метилэстра-1,3,5(10)-триен-3,17β-диол, CAS 6171-48-8;

примесь D: Эстра-1,3,5(10),9(11)-тетраен-3,17β-диол, CAS 791-69-5.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 25 × 0,46 см, силикагель октадецилсилильный, эндкепированный для хроматографии (С18), 5 мкм; |
| Температура колонки | 25 °С; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 280 нм; |
| Объём пробы | 20 мкл; |
| Время хроматографирования | двукратное от времени удерживания основного пика. |

Колонку уравновешивают ПФ не менее 60 мин, после чего хроматографируют испытуемый раствор, раствор для проверки пригодности хроматографической системы и растворы сравнения А, Б и В.

*Идентификация примесей*. Для идентификации примесей А, В и С и используют хроматограмму, прилагаемую к стандартному образцу эстрадиола для идентификации пиков и хроматограмму раствора сравнения Б. Для идентификации примеси D используют хроматограмму раствора сравнения В.

*Относительные времена удерживания соединений*. Эстрадиол – 1 (около 13 мин); примесь D – около 0,9; примесь В – около 1,1; примесь А – около 1,4; примесь С – около 1,9.

*Пригодность хроматографической системы*: На хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы:

– *разрешение (R)* между пиками эстрадиола и примеси В должно быть не менее 2,5.

*Поправочный коэффициент.* Для расчёта содержания площадь пика примеси D умножается на 0,4.

*Допустимое содержание примесей.* На хроматограмме испытуемого раствора:

- площади пиков каждой из примесей A, B, С и D не должны более чем в полтора раза превышать площадь основного пика на хроматограмме раствора сравнения А (не более 0,3 %);

- площадь пика любой другой примеси не должна превышать половину площади основного пика на хроматограмме раствора сравнения А (не более 0,1 %);

- суммарная площадь пиков всех примесей не должна превышать 2,5 площади основного пика на хроматограмме раствора сравнения А (не более 0,5).

Не учитывают пики, площадь которых составляет менее 0,25 площади основного пика на хроматограмме растворасравнения А (менее 0,05 %).

**Вода.** От 2,9 % до 3,5 %.(ОФС «Определение воды», метод 1). Для определения используют около 0,5 г (точная навеска) субстанции.

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

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

**Количественное определение**. Определение проводят методом спектрофотометрии.

Около 20 мг (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в спирте 96 % и доводят объём раствора тем же растворителем до метки. 5,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объём раствора 0,1 М раствором натрия гидроксида до метки. Охлаждают до комнатной температуры.

Измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 238 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения смесь спирт 96 % **–** 0,1 М раствор натрия гидроксида 1:10.

Содержание эстрадиола C18H24O2 в процентах (*Х*) в пересчёте на безводное и свободное от остаточных органических растворителей вещество вычисляют по формуле:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *A* | − | оптическая плотность испытуемого раствора; |
|  | *а* | − | навеска субстанции, г; |
|  | 335 | − | удельный показатель поглощения эстрадиола (); |
|  | *W* | − | суммарное содержание воды и остаточных органических растворителей в субстанции, %. |

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