|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Тестостерон** |  | **ФС** |
| **Тестостерон** |  |  |
| **Testosteronum** |  | **Вводится впервые** |

|  |
| --- |
|  |

|  |  |
| --- | --- |
| 17β-Гидроксиандрост-4-ен-3-он | |
|  | |
| C19H28O2 | М.м.288,42 |

Содержит не менее 97,0 % и не более 103,0 % тестостерона C19H28O2в пересчёте на сухое вещество.

**Описание.** Белый или почти белый кристаллический порошок или бесцветные или желтовато-белые кристаллы.

**Растворимость.** Практически нерастворим в воде, легко растворим в спирте 96 % и метиленхлориде.

**Подлинность.** *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 тестостерона.

Температура плавления. От 153 до 157 °С (ОФС «Температура плавления», метод 1).

Угол вращения. От +106 до +114 (1 % раствор субстанции в этаноле, ОФС «Поляриметрия»).

Родственные примеси.

*Примеси Dи F*

Определение проводят методом ТСХ (ОФС «Тонкослойная хроматография»).

*Пластинка.* ТСХ пластинка со слоем силикагеля F254.

*Подготовка пластинки (в темноте).* Прибавляют 5 г серебра нитрата к 100 мл метанола, перемешивают в течение 30 мин и фильтруют или декантируют. Пластинку погружают в полученный раствор не менее чем на 30 мин, вынимают и сушат при 75 °С в течение 30 мин. Пластинка пригодна в течение 5-7 дней при хранении в темноте.

*Подвижная фаза (ПФ).* Уксусная кислота разведённая 30 %–этанол–диоксан–метиленхлорид 1:2:10:90.

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

*Раствор сравнения А.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,0 мл испытуемого раствора и доводят объём раствора метанолом до метки.

*Раствор сравнения Б.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 2,0 мл раствора сравнения А и доводят объём раствора метанолом до метки.

*Раствор сравнения В.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 1,0 мл раствора сравнения А и доводят объём раствора метанолом до метки.

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 1 мг стандартного образца андростанолона (примесь F), растворяют в метаноле и доводят объём раствора тем же растворителем до метки. В 1 мл полученного раствора растворяют 10 мг стандартного образца тестостерона для идентификации примеси D, содержащий около 1 % примеси D.

*Реактив для детектирования.* Раствор толуолсульфоновой кислоты 200 г/л в этаноле.

Примечание.

Примесь D: андрост-4-ен-3β,17β-диол, CAS 1156-92-9;

Примесь F (андростанолон): 17β-гидрокси-5α-андростан-3-он, CAS 521-18-6.

На линию старта пластинки наносят по 2 мкл испытуемого раствора (20 мкг), раствора сравнения А (0,2 мкг), раствора сравнения Б (0,04 мкг), раствора сравнения В (0,02 мкг) и раствора для проверки пригодности хроматографической системы. Пластинку с нанесёнными пробами высушивают на воздухе в течение 5 мин, помещают в камеру с ПФ и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт ПФ пройдёт 80-90 % длины пластинки от линии старта, её вынимают из камеры ивысушивают, выдерживая в защищённом от света месте при комнатной температуре в течение 30 мин. Пластинку опрыскивают реактивом для детектирования, нагревают до температуры 105 °С в течение 10 мин и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

Хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы чётко видны три зоны адсорбции.

*Факторы удерживания соединений (Rf*): примесь D – около 0,5, тестостерон – около 0,65 и примесь F – около 0,7.

На хроматограмме испытуемого раствора:

– зона адсорбции примеси D по совокупности величины и интенсивности поглощения не должна превышать зону адсорбции на хроматограмме раствора сравнения Б (не более 0,2 %);

– зона адсорбции примеси F по совокупности величины и интенсивности поглощения не должна превышать зону адсорбции на хроматограмме раствора сравнения В (не более 0,1 %).

*Другие примеси*

Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

*Подвижная фаза А (ПФА).* Вода—метанол 450:550.

*Подвижная фаза Б (ПФБ).* Метанол.

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

*Раствор сравнения А.* В мерную колбу вместимостью 20 мл помещают 1,0 мл испытуемого раствора и доводят объём раствора метанолом до метки. В мерную колбу вместимостью 10 мл переносят 1,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора метанолом до метки.

*Раствор сравнения Б.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 2,0 мл раствора сравнения А и доводят объём раствора метанолом до метки.

*Раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы.* растворяют 10 мг стандартного образца тестостерона для проверки пригодности системы (содержит примеси С и I) в 1,0 мл метанола.

Примечание.

Примесь А: андрост-4-ен-3,17-дион, CAS 63-05-8;

Примесь В: 3-этоксиандроста-3,5-диен-17-он, CAS 972-46-3;

Примесь С: 17α-гидроксиандрост-4-ен-3-он, CAS 481-30-1;

Примесь Е: (3-оксоандрост-4-ен-17β-ил)ацетат, CAS 1045-69-8;

Примесь G: андроста-1,4-диен-3β,17β-дион, CAS 897-06-3;

Примесь Н: 17β-гидроксиандроста-1,4-диен-3-он, CAS 846-48-0;

Примесь I: 17β-гидроксиандроста-4,6-диен-3-он, CAS 2484-30-2;

Примесь J: 3-метоксиандрост-3,5-диен-17-он, CAS 57144-06-6.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 250 × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный, эндекпированный для хроматографии (С18), 5 мкм, с размером пор 15 нм; |
| Температура колонки | 40 °С; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 254 нм; |
| Объём пробы | 20 мкл. |

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФА, % | ПФБ, % |
| 0–4 | 100 | 0 |
| 4–24 | 100 → 60 | 0→ 40 |
| 24–53 | 60 → 0 | 40 → 100 |
| 53–55 | 0 | 100 |

Хроматографируют раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы, испытуемый раствор и растворы сравнения А и Б.

*Идентификация примесей.* Для идентификации пиков примесей С и I используется хроматограмма раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы.

*Относительное время удерживания соединений.* Тестостерон – 1 (около 18 мин); примесь G–около 0,6; примесь Н – около 0,8; примесь А – около 0,9; примесь I – около 0,95; примесь С – около 1,2; примесь Е – около 1,7; примесь J – около 2,1; примесь В – около 2,5.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы *разрешение (RS)* между пиками примеси I и тестостерона должно быть не менее 2,0.

*Поправочные коэффициенты.* Для расчёта содержания площадь пика примеси I умножают на 2,9.

*Допустимое содержание примесей.* На хроматограмме испытуемого раствора:

– площадь пика примеси С не должна превышать площадь основного пика на хроматограмме раствора сравнения А (не более 0,5 %);

– площадь пика примеси I не должна превышать двукратную площадь основного пика на хроматограмме раствора сравнения Б (не более 0,2 %);

– площади пиков каждой из примесей А, В, Е, G, H и J не должны превышать площадь основного пика на хроматограмме раствора сравнения Б (не более 0,1 %);

– площадь пика любой другой примеси не должна превышать площадь основного пика на хроматограмме раствора сравнения Б (не более 0,1 %);

– суммарная площадь пиков всех примесей не должна более чем в 1,2 раза превышать площадь основного пика на хроматограмме раствора сравнения А (не более 0,6 %).

Не учитывают пики, площадь которых составляет менее 0,5 площади основного пика на хроматограмме раствора сравнения Б (менее 0,05 %).

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

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

Тяжёлые металлы. Не более 0,001 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Тяжёлые металлы», метод 2, в зольном остатке, полученном после сжигания 1,0 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 спектрофотометрии (ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»).

*Испытуемый раствор.*Около 50 мг (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в спирте 96 % и доводят объём раствора тем же растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 2,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора спиртом 96 % до метки.

Измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 241 нм в кювете с толщиной слоя 1 см, используя в качестве раствора сравнения спирт 96 %.

Содержание тестостерона C19H28O2 в процентах (*Х*) в пересчёте на сухое вещество вычисляют по формуле:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *A* | − | оптическая плотность испытуемого раствора; |
|  | *а* | − | навеска субстанции, г; |
|  | 569 | − | удельный показатель поглощения тестостерона (); |
|  | *W* | − | потеря в массе при высушивании, %. |

Хранение. В защищённом от света месте.