

Application Bulletin

Von Interesse für: Organische Chemie; Pharmazie;
Biochemie, Biologie, Medizin

B 3, 4, 8

Polarographische Bestimmung von Diazepam in Körperflüssigkeiten und pharmazeutischen Präparaten

Zusammenfassung

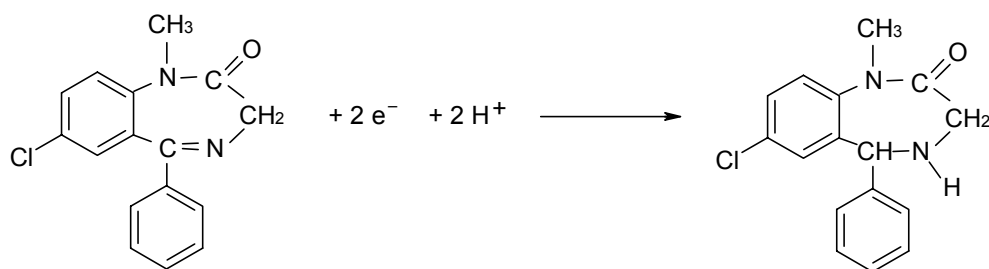
Diazepam ist eine Verbindung aus der Gruppe der 1,4-Benzodiazepine, die in der Medizin als sogenannte «Tranquilizer» (Beruhigungsmittel) und Antidepressiva eingesetzt werden.

Das vorliegende Bulletin beschreibt die Bestimmung von Diazepam in Tabletten und Körperflüssigkeiten (Blut, Serum, Urin) unter Verwendung der Differential-Pulse-Polarographie. Wird als Grundelektrolyt Britton-Robinson-Puffer pH = 2,8 mit einem Methanol-Volumenanteil von 20% eingesetzt, so erhält man bei ca. $-0,73$ V einen ausgeprägten Reduktionspeak, der es erlaubt, in Blut selbst noch Diazepam-Konzentrationen $<0,05$ $\mu\text{g/mL}$ zu bestimmen. Auf die notwendigen Probenvorbereitungsschritte wird ebenfalls eingegangen.

Theorie

Diazepam löst sich sehr schlecht in Wasser, aber gut in Methanol, Chloroform, n-Pentan, Diethylether und verdünnten Mineralsäuren. Schwefelsäure der Konzentration $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,1$ mol/L hydrolysiert das Diazepam und verhindert damit seine genaue Bestimmung. Durch Verwendung des beschriebenen Grundelektrolyten ist gewährleistet, dass sich Diazepam gut löst, aber keine unerwünschte Hydrolyse stattfindet.

Bei ca. $-0,73$ V erfolgt die Reduktion der Gruppierung $-\text{CR}=\text{N}-$ im Diazepam durch Aufnahme von zwei Elektronen (sowie zwei H^+ -Ionen) zu $-\text{CHR}-\text{NH}-$:



Geräte und Zubehör

- VA Trace Analyzer 746 mit VA-Stand 747 oder VA Computrace 757
- Magnetrührer
- Zentrifuge
- Analysenwaage (Mindestauflösung 0,1 mg)
- Trockenschrank
- Exsikkator
- Rotationsverdampfer
- Mörser, Scheidetrichter, Messkolben, Messzylinder, Mess- und Vollpipetten, Bechergläser

Reagenzien

Zur Herstellung der Lösungen werden nur Reagenzien von höchster Reinheit sowie Reinstwasser verwendet. Die organischen Lösungsmittel sollten einen für die HPLC geeigneten Reinheitsgrad aufweisen.

- n-Pentan
- Methanol
- Methanol : Reinstwasser = 1 : 1, d.h. $\phi(\text{CH}_3\text{OH}) = 50\%$
- Natronlauge $c(\text{NaOH}) = 4 \text{ mol/L}$; dies entspricht einer Massenkonzentration von 160 g NaOH pro Liter Reinstwasser
- Phosphorsäure $w(\text{H}_3\text{PO}_4) = 85\%$
- Grundelektrolyt: Britton-Robinson-Puffer pH = 2,8:

In einen 1000-mL-Messkolben gibt man 200 mL Methanol und 1,75 mL $w(\text{H}_3\text{PO}_4) = 85\%$ und füllt mit Reinstwasser zur Marke auf. 200 mL dieser Lösung werden in ein Becherglas gegeben und mit 160 mL Methanol sowie 640 mL Reinstwasser versetzt. Dann stellt man den pH-Wert der Lösung mit $c(\text{NaOH}) = 4 \text{ mol/L}$ auf 2,8 ein. Der Grundelektrolyt wird in einer gut verschlossenen Glasflasche aufbewahrt.

- Diazepam-Standardlösungen:
 - Stammlösung der Konzentration 1000 ppm:
Ca. 0,5 g Reinsubstanz werden bei etwa 70 °C während 24 h im Trockenschrank getrocknet; anschliessend lässt man im Exsikkator abkühlen. Man wiegt 100,0 mg des derart vorbereiteten Diazepams in einen 100-mL-Messkolben ein, löst in 50 mL Methanol, füllt mit Reinstwasser zur Marke auf und mischt. Die Stammlösung wird im Dunkeln an einem kühlen Ort aufbewahrt und ist ungefähr eine Woche haltbar.
 - Arbeitslösungen der Konzentrationen 50 ppm, 100 ppm und 200 ppm:
Die Diazepam-Arbeitslösungen werden aus der 1000-ppm-Stammlösung durch Verdünnen mit $\phi(\text{CH}_3\text{OH}) = 50\%$ hergestellt. Sie sind ebenfalls im Dunkeln an einem kühlen Ort aufzubewahren und sind zwei bis drei Tage haltbar.

Probenvorbereitung

1. Tabletten

10 Tabletten werden gewogen, um ihre Durchschnittsmasse zu ermitteln, und anschliessend im Mörser fein zerstoßen. In ein Becherglas wird die Menge an Tablettenpulver eingewogen, die der durchschnittlichen Masse einer Originaltablette entspricht. Man versetzt mit 35 mL Methanol, bedeckt mit einem Uhrglas und rührt während 20 min auf einem Magnetrührer. Nach Ablauf dieser «Extraktionszeit» spült man die Mischung mit $\phi(\text{CH}_3\text{OH}) = 50\%$ quantitativ in einen 50-mL-Messkolben, füllt zur Marke auf und mischt sehr gut. Der verschlossene Messkolben wird an einen kühlen, dunklen Ort gestellt, damit sich die unlöslichen Rückstände absetzen können.

2. Vollblut, Serum, Urin

Dem Patienten werden auf die übliche Weise 15,0 mL Blut entnommen (Heparin-Zusatz zur Verhinderung der Blutkoagulation) und sofort in einen 60-mL-Scheidetrichter gegeben, der bereits 40 mL n-Pentan enthält. Man extrahiert während 2 min unter intensivem Schütteln, wartet, bis sich die beiden Phasen getrennt haben (dabei ist die Zeit so kurz wie möglich zu halten) und lässt die Blutphase dann in einen zweiten Scheidetrichter ab, der 20 mL n-Pentan enthält. Die Pentanphase gibt man in ein Zentrifugenglas. Das Blut wird auf die gleiche Art ein zweites und drittes Mal extrahiert und die einzelnen Pentanextrakte werden im Zentrifugenglas vereinigt. Die Probe ist 10 min lang bei 7500 U/min zu zentrifugieren. Anschliessend wird das n-Pentan am Rotationsverdampfer bei 70 °C abdestilliert. Den resultierenden Trockenrückstand löst man mit 500 µL Methanol und spült ihn dann mit 14,5 mL Grundelektrolyt ins Polarographiegefäss. Serum- und Urinproben werden in gleicher Weise vorbereitet.

Analyse

1,00 mL Tablettenextrakt sowie 19,0 mL Grundelektrolyt bzw. die entsprechend vorbereitete Blut-, Serum- oder Urinprobe (siehe oben) werden ins Polarographiegefäss gegeben und 5 min mit Stickstoff entlüftet. (Die am VA-Stand angebrachte Waschflasche für den Stickstoff ist ebenfalls mit dem Grundelektrolyten zu füllen.) Anschliessend werden die Polarogramme unter folgenden Bedingungen aufgenommen:

Methode / Amplitude	DP / –50 mV
Elektrode	DME oder SMDE
U.start	–0,50 V
U.end	–0,95 V
Sweep rate	12,5 mV/s

Das Peakpotential des Diazepams liegt bei ca. –0,73 V.

Die Konzentrationsermittlung erfolgt durch zweifache Standardaddition.

Bemerkungen

- Von den verwendeten Chemikalien ist eine Blindprobe (Basislinie) aufzunehmen und bei der Ergebnisberechnung entsprechend zu berücksichtigen.
- Die Absolutmasse an Diazepam im Polarographiegefäß sollte, inklusive der Standardadditionen, nicht mehr als 200 µg betragen, da man sich sonst ausserhalb des linearen Arbeitsbereiches befindet.
- Die erhaltenen Polarogramme sind leicht asymmetrisch. Dies hat aber keinen Einfluss auf die Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der Ergebnisse.
- Weitere Tablettenbestandteile, die unter Umständen ebenfalls elektrochemisch aktiv sind, stören die polarographische Diazepam-Bestimmung nicht.
- Neben Diazepam können auch andere Verbindungen aus der Gruppe der 1,4-Benzodiazepine (z.B. Nitrazepam) sowie 1,5-Benzodiazepine polarographisch bestimmt werden. Hierbei erhält man – insbesondere wenn die Verbindungen Nitrogruppen aufweisen – eventuell zusätzliche Reduktionspeaks im Polarogramm.
- In den mit einem Gehalt von 2 mg Diazepam/Tablette ausgewiesenen Tabletten wurden $1,984 \pm 0,021$ mg Diazepam gefunden. Zwei weitere Proben ergaben einen Gehalt von $1,94 \pm 0,034$ mg Diazepam.

Die Blutprobe eines Patienten ergab ca. 2 h nach Einnahme der Tabletten einen Gehalt von 0,960 µg Diazepam/15 mL bzw. 0,064 µg Diazepam/mL.

Literatur

- E. Jacobsen, T. V. Jacobsen
Polarographic determination of diazepam in pharmaceuticals
Anal. Chim. Acta 60 (1972) 472–474.
- J. Fidelus, M. Zietek, A. M. Kolajek, Z. Grochowska
Mikrochim. Acta (1974/I) 84 ff.
- C. Cimbura, R. C. Gupta
J. Forensic Sci. 10 (1965) 228 ff.
- D. J. Berry
Clin. Chim. Acta 32 (1971) 235 ff.
- W. F. Smyth, J. S. Burmicz, A. Iwasaka
On-line electrochemical detection of oxidisable organic molecules of pharmaceutical importance
Analyst 107 (1982) 1019–1025.
- M. A. Brooks, L. D'Arconte, M. R. Hackman, J. A. F. da Silva
J. Anal. Toxicol. 1 (1977) 179 ff.
- M. A. Brooks
Bioelectrochem. Bioenergetics 10 (1983) 37 ff.
- W. F. Smyth, M. R. Smyth, J. A. Groves, S. B. Tan
Analyst 103 (1978) 497 ff.
- J. Volke
Polarographic and voltammetric methods in pharmaceutical chemistry and pharmacology
Bioelectrochem. Bioenergetics 10 (1983) 7 ff.
- H. Oelschläger
Polarographic analysis of psychotropic drugs
Bioelectrochem. Bioenergetics 10 (1983) 25 ff.

```

===== METROHM 693 VA PROCESSOR (5.693.0020) =====
Method Diazdet .mth          OPERATION SEQUENCE
Title Detn.of Diazepam in Pharmaceutical Products
    
```

	Instructions	t/s	Main parameters	Auxiliary parameters
1	SMPL/M		V.fraction 1.000 mL	V.total 50.0 mL
2	DOS/M		V.added 19.000 mL	
3	PURGE			
4	STIR	300.0	Rot.speed 2000 /min	
5	<ADD			
6	NOP	15.0		
7	SEGMENT		Segm.name diaz	
8	ADD>M		Soln.name dizstd	V.add 0.100 mL
9	ADJZE			
10	END			

```

Method: Diazdet          SEGMENT
                          diaz
    
```

	Instructions	t/s	Main parameters	Auxiliary parameters
1	<REP			
2	ØPURGE			
3	ØSTIR			
4	ØME			
5	ØPMODE		U.ampl -50 mV	t.meas 20.0 ms
			t.step 0.80 s	t.pulse 40.0 ms
6	SWEEP	39.2	U.start -500 mV	U.step 10 mV
			U.end -950 mV	Sweep rate 12.5 mV/s
7	ØMEAS			
8	REP>1			
9	PURGE			
10	STIR		Rot.speed 2000 /min	
11	END			

```

Method: Diazdet          DOCUMENTATION
    
```

Auto form feed no

COPY Reports, Curves

TO Destination

Curve Smth Sbst:diazepam VR:**

Printer

Report Full

Printer

Curve Cal Sbst:diazepam

Printer

Report MethSpc

Printer

Abb. 1: Methode für die polarographische Bestimmung von Diazepam in Tabletten (durchgeführt am VA Trace Analyzer 693): «Operation Sequence», Segment und Dokumentation.

Method: Diazdet		SUBSTANCES diazepam - diaz			
Recognition		Display / Plot			
U.verify	-725 mV	I.scale	auto		
U.tol (+/-)	30 mV	U.div	50 mV/cm		
U.width min	10 mV	U.begin	mV		
U.width max	200 mV	U.end	mV		
I.threshold	250 pA				
Baseline		Evaluation (for peaks only)			
Type	linear	Quantity	I.peak		
Scope	whole				
dU.front	auto				
S.front	auto				
dU.rear	auto				
S.rear	auto				
Calibration	94-02-01 15:10	Coefficients			
Technique	std.add.	Y.reg	-4.922e-08		
Curve type	linear	Slope	-2.439e-05		
		Nonlin.			
		Mean dev.	2.712e-10		
Additions					
Soln.name	dizstd				
Mass conc.	200 mg/L	g/L	g/L	g/L	g/L
Range min	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L
Range max	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L
M.conc./cm	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L
Method: Diazdet	CALCULATION max. 15 lines				
Quantity	Formula (R##, C##, A##)	Res.unit	Sig.dig.		
diazepam	R1=MC:diazepam*158.6*50/(1000*50)	mg/50 ml	4		

Abb. 2: Methode (Fortsetzung): Substanzen und Berechnung.

```

===== METROHM 693 VA PROCESSOR (5.693.0020) =====
Determ.   : 02011317           User:           Date: 94-02-01
Modified  : 94-02-01 14:01:41  Run: 1         Time: 13:47:19
Sample table: -
    
```

```

-----
Pos.  Ident.1/S1  Ident.2/S2  Ident.3/S3  Method.call  Sample size/S0
      1.0                158.1 mg
    
```

```

Method : Diazdet
Title  : Detn. of Diazepam in Pharmaceutical Products
Remark1 : Ag/AgCl(3MKCl) reference electrode
Remark2 : Tab.wt. 30mL methanol.Dil. to 100.00mL with M-QW
    
```

```

Substance : diazepam           Comments
Mass conc. : 39.56 mg/L       Mass : 39.56 ug
MC.dev.    : 0.416 mg/L (1.05%)  Add.mass : 20 ug
Cal.dev.   : -                V0.sample: 1 mL
    
```

VR	U/mV	I/nA	I.mean	Std.dev.	I.delta	Comments
00	-724	-64.36	-64.69	0.4725		
01	-724	-65.03				
10	-724	-96.20	-96.44	0.3452	-31.75	
11	-724	-96.68				
20	-723	-128.8	-128.7	0.1539	-32.25	
21	-724	-128.6				

Substance	Techn.	Y.reg/offset	Slope	Nonlin.	Std.add.mass
diazepam	std.add.	-6.456e-08	-3.264e-05		20 ug

SOLUTIONS
max. 40

Soln.name	Pos.	Std.subst.	Mass conc.	Remark
dizstd	-	diazepam	200.0 mg/L	

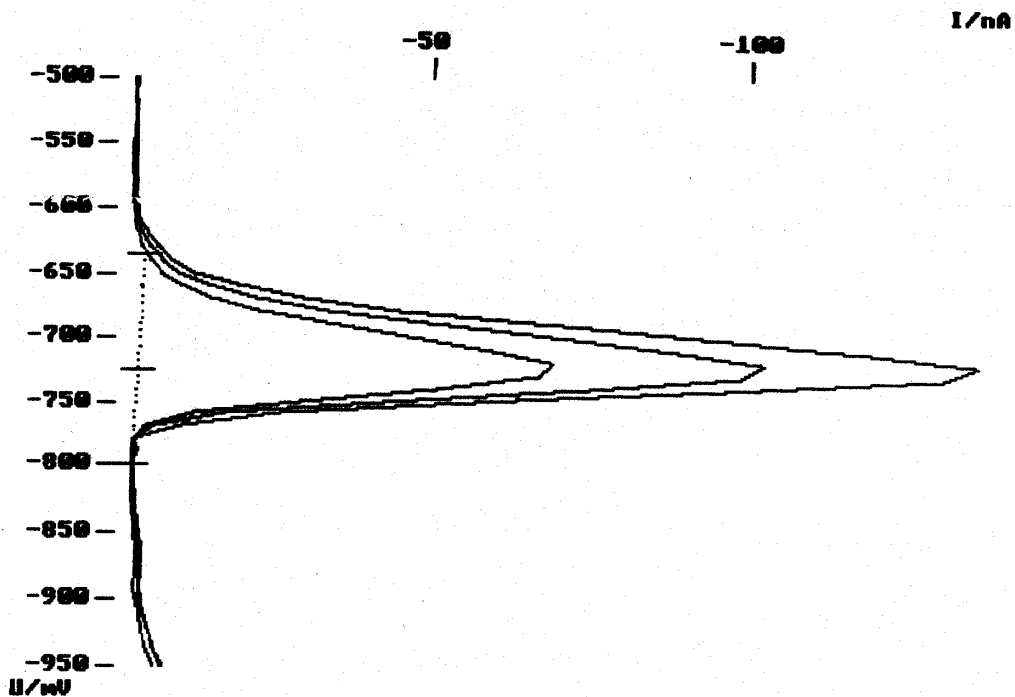
C# Workg.com.var Remark

Final results	+/-	Res.dev.	%	Comments
diazepam = 1.984 mg/50 ml	0.021	1.05		

Abb. 3: Vollständiges Protokoll für die Bestimmung von Diazepam in Tabletten.

```

===== METROHM 693 VA PROCESSOR (5.693.0020) =====
Method : Diazdet      User      :      Date : 94-02-01
Mode   : DPMODE      Determ. : 02011347   Time  : 13:47:19
Run    : 1
Curve  : smoothed    Segment : diaz      V R   : x 0
    
```



Substance :	diazepam	U =	-724 mV	I =	-64.358 nA
Substance :	diazepam	U =	-724 mV	I =	-96.196 nA
Substance :	diazepam	U =	-723 mV	I =	-128.798 nA

Abb. 4: Polarogramme für die Bestimmung von Diazepam in Tabletten.


```

===== METROHM 693 VA PROCESSOR (5.693.0020) =====
Determ.   : 05120947      User:           Date: 94-05-12
Modified  : no           Run : 1           Time: 09:47:59
Sample table: -
    
```

```

-----
Pos.  Ident.1/S1  Ident.2/S2  Ident.3/S3  Method.call  Sample size/S0
-----
                               15.0 mL
    
```

```

-----
Method : Diazdet
Title  : Detn.of Diazepam in Blood Samples (Polarographic)
Remark1 : Ag/AgCl (3M KCl) reference electrode
Remark2 : 15.0 mL B/R buffer 2.8 pH. This is for "blank"
-----
    
```

```

Substance : diazepam      Comments
Mass conc. : 14.14 ug/L   Mass : 212.2 ng
MC dev.    : 2.35 ug/L (16.6%)  Add.mass : 1 ug
Cal dev.   : -            V0.sample: 15 mL
    
```

VR	U/mV	I/nA	I.mean	Std.dev.	I.delta	Comments
00	-719	-0.5130	-0.5448	0.0450		front overlapping
01	-715	-0.5766				
10	-724	-2.765	-2.818	0.0757	-2.274	
11	-724	-2.872				
20	-723	-5.223	-5.312	0.1263	-2.493	
21	-723	-5.401				

Substance	Techn.	Y.reg/offset	Slope	Nonlin.	Std.add.mass
diazepam	std.add.	-5.072e-10	-3.588e-05		1 ug

SOLUTIONS
max. 40

Soln.name	Pos.	Std.subst.	Mass conc.	Remark
dizstd	-	diazepam	50.0 mg/L	

C#	Workg.com.var	Remark

Final results	+/-	Res.dev.	%	Comments
diazepam = 0.212 ug/15 mL	0.035	16.6		

Abb. 5: Vollständiges Protokoll für die Bestimmung von Diazepam in Blut.

===== METROHM 693 VA PROCESSOR (5.693.0020) =====
Method : Diazdet User : Date : 94-05-12
Mode : DPMODE Determ. : 05120947 Time : 09:47:59
Run : 1 Sample :

Standard addition curve
Curve type : lin Slope : -3.588e-05 Mean.dev. : 1.010e-10
Mode : const Y.reg : -5.072e-10

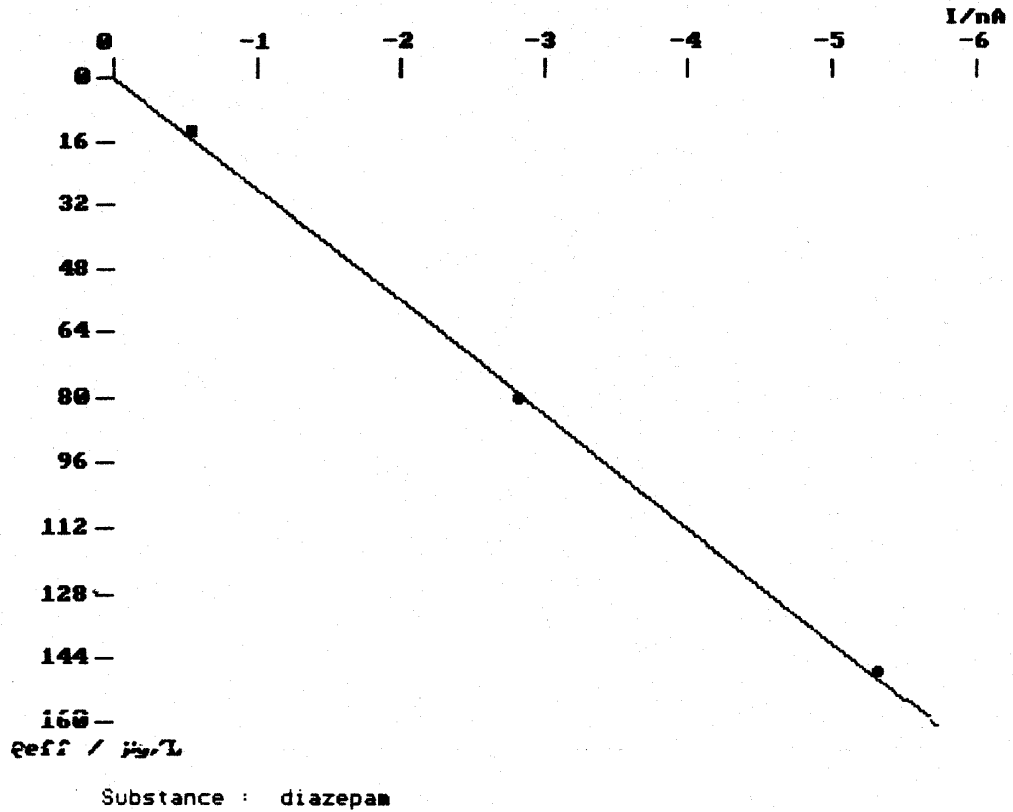


Abb. 6: Standardadditionskurve für die Bestimmung von Diazepam in Blut.