

Application Bulletin

D'intérêt pour: Chimie organique; Industrie pharmaceutique;
Biochimie, biologie, médecine

B 3, 4, 8

Détermination polarographique du diazépam dans les liquides de l'organisme et les préparations pharmaceutiques

Résumé

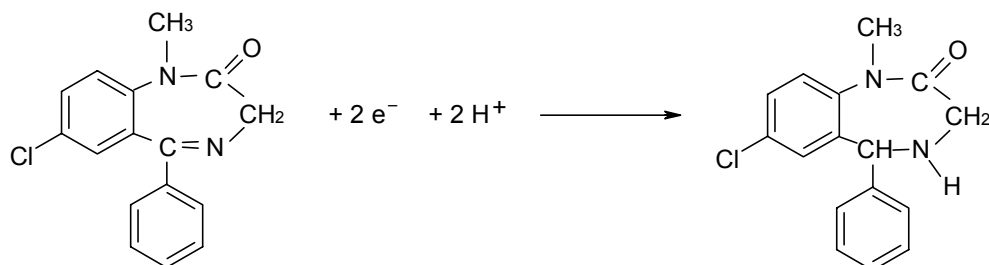
Le diazépam est un composé du groupe des 1,4-benzodiazépines qui sont employées en médecine comme tranquillisants et antidépresseurs.

Le présent bulletin décrit la détermination du diazépam dans les comprimés et les liquides de l'organisme (sang, sérum, urine) par polarographie à impulsion différentielle (polarographie «differential pulse»). Si l'on utilise comme électrolyte de base le tampon Britton-Robinson pH = 2,8 avec une part de méthanol correspondant à 20% du volume, on obtient un pic de réduction marqué à environ $-0,73$ V. Celui-ci permet de déterminer dans le sang des concentrations de diazépam même inférieures à $0,05$ $\mu\text{g/mL}$. Les phases de préparation de l'échantillon sont également présentées dans ce bulletin.

Théorie

Le diazépam se dissout très mal dans l'eau mais bien dans le méthanol, le chloroforme, le n-pentane, l'éther diéthylique et les acides minéraux dilués. L'acide sulfurique d'une concentration de $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,1$ mol/L hydrolyse le diazépam et empêche ainsi sa détermination exacte. L'utilisation de l'électrolyte de base décrit garantit une bonne dissolution du diazépam sans hydrolyse indésirée.

À environ $-0,73$ V, le groupe $-\text{CR}=\text{N}-$ dans le diazépam est réduit à $-\text{CHR}-\text{NH}-$ par absorption de deux électrons (ainsi que de deux ions H^+):



Appareils et accessoires

- VA Trace Analyzer 746 avec Poste VA 747
ou
VA Computrace 757
- Agitateur magnétique
- Centrifugeuse
- Balance pour analyses (résolution minimale 0,1 mg)
- Étuve
- Dessiccateur
- Évaporateur rotatif
- Mortier, entonnoir à séparation, ballons gradués, éprouvettes graduées, pipettes graduées et pipettes volumétriques, béchers

Réactifs

Pour la préparation des solutions, seuls des réactifs de très grande pureté et de l'eau extra-pure sont utilisés. Les solvants organiques doivent présenter un degré de pureté approprié pour la HPLC.

- n-Pentane
- Méthanol
- Méthanol : eau extra-pure = 1 : 1, c.-à-d. $\phi(\text{CH}_3\text{OH}) = 50\%$
- Soude caustique $c(\text{NaOH}) = 4 \text{ mol/L}$; ceci correspond à une concentration de masse de 160 g de NaOH par litre d'eau extra-pure
- Acide phosphorique $w(\text{H}_3\text{PO}_4) = 85\%$
- Électrolyte de base: tampon Britton-Robinson $\text{pH} = 2,8$:

Placer 200 mL de méthanol et 1,75 mL de $w(\text{H}_3\text{PO}_4) = 85\%$ dans un ballon gradué de 1000 mL et compléter à la marque avec de l'eau extra-pure. Placer 200 mL de cette solution dans un bécher et ajouter 160 mL de méthanol ainsi que 640 mL d'eau extra-pure, puis ajuster la valeur pH de la solution à 2,8 avec $c(\text{NaOH}) = 4 \text{ mol/L}$. L'électrolyte de base est à conserver dans un flacon en verre bien fermé.

- Solutions standards de diazépam:
 - Solution de base d'une concentration de 1000 ppm:
Sécher environ 0,5 g de la substance pure dans une étuve à environ 70 °C pendant 24 h, puis laisser refroidir la substance dans le dessiccateur. Peser 100,0 mg du diazépam ainsi préparé dans un ballon gradué de 100 mL, les dissoudre dans 50 mL de méthanol, compléter à la marque avec de l'eau extra-pure et mélanger bien. La solution de base est à conserver au frais, dans l'obscurité; elle est stable pendant près d'une semaine.
 - Solutions de travail d'une concentration de 50 ppm, 100 ppm et 200 ppm:
Les solutions de travail de diazépam sont préparées à partir de la solution de base de 1000 ppm par dilution avec $\phi(\text{CH}_3\text{OH}) = 50\%$. Elles doivent elles aussi être conservées au frais, dans l'obscurité, et sont stables pendant deux à trois jours.

Préparation de l'échantillon

1. Comprimés

Peser 10 comprimés afin d'en déterminer la masse moyenne et les briser finement dans le mortier. Peser dans un bécher la quantité de poudre de comprimé qui correspond à la masse moyenne d'un comprimé original. Ajouter 35 mL de méthanol et couvrir le bécher avec un verre de montre, puis agiter le mélange pendant 20 min sur un agitateur magnétique. Une fois ce «temps d'extraction» écoulé, rincer quantitativement le mélange avec $\phi(\text{CH}_3\text{OH}) = 50\%$ dans un ballon gradué de 50 mL, compléter à la marque et mélanger bien. Placer le ballon gradué fermé dans un endroit frais et sombre pour permettre la précipitation des résidus insolubles.

2. Sang complet, sérum, urine

Prélever 15,0 mL de sang sur le patient dans les conditions standards (addition d'héparine pour empêcher la coagulation du sang) et les placer immédiatement dans un entonnoir à séparation de 60 mL qui contient déjà 40 mL de n-pentane. Extraire pendant 2 min tout en secouant vivement, attendre que les deux phases se soient séparées (il faut attendre le moins longtemps possible) et déverser ensuite la phase de sang dans un deuxième entonnoir à séparation qui contient 20 mL de n-pentane. La phase de pentane est transvasée dans un verre de centrifugeuse. Procéder de la même façon pour extraire le sang une deuxième ou une troisième fois, puis réunir les divers extraits de pentane dans le verre de centrifugeuse. L'échantillon doit être centrifugé pendant 10 min à 7500 min^{-1} . Distiller ensuite le n-pentane avec l'évaporateur rotatif à 70°C . Dissoudre le résidu sec ainsi résultant avec 500 μL de méthanol, puis le rincer dans le récipient de polarographie avec 14,5 mL d'électrolyte de base. Les échantillons de sérum et d'urine sont préparés de la même façon.

Analyse

Placer 1,00 mL de l'extrait de comprimé et 19,0 mL d'électrolyte de base ou l'échantillon de sang, de sérum ou d'urine préparé (voir ci-dessus) dans le récipient de polarographie et purger avec de l'azote pendant 5 min. (Le flacon laveur pour l'azote installé sur le Poste VA doit lui aussi être rempli d'électrolyte de base.) Enregistrer ensuite les polarogrammes dans les conditions suivantes:

Méthode / amplitude	DP / -50 mV
Electrode	DME ou SMDE
U.start	$-0,50 \text{ V}$
U.end	$-0,95 \text{ V}$
Sweep rate	$12,5 \text{ mV/s}$

Le potentiel de pic du diazépam est à environ $-0,73 \text{ V}$.

La concentration est déterminée par addition standard double.

Remarques

- Il faut procéder à une analyse à blanc (ligne de base) des réactifs utilisés et en tenir compte lors du calcul des résultats.
- La masse absolue de diazépam dans le récipient de polarographie ne doit pas être de plus de 200 µg, y compris les additions standards, étant donné qu'on se trouverait sinon au-delà de la gamme de linéarité.
- Les polarogrammes obtenus sont légèrement asymétriques, mais cela n'influe pas sur la reproductibilité et la précision des résultats.
- D'autres constituants des comprimés qui peuvent être eux aussi actifs électrochimiquement, n'interfèrent pas lors de la détermination polarographique du diazépam.
- Outre le diazépam, d'autres composé du groupe des 1,4-benzodiazépines (p.ex. nitrazépam) ainsi que les 1,5-benzodiazépines peuvent aussi être déterminées par polarographie. Dans ces cas-là, on obtient éventuellement des pics de réduction additionnels dans le polarogramme – notamment si les composés contiennent des groupes nitro.
- 1,984 ± 0,021 mg de diazépam ont été trouvé dans les comprimés marqués d'une teneur de 2 mg de diazépam par comprimé. Deux autres échantillons ont donné une teneur de 1,94 ± 0,034 mg de diazépam.

L'échantillon de sang d'un patient a révélé une teneur de 0,960 µg de diazépam/15 mL ou 0,064 µg de diazépam/mL, environ 2 h après la prise des comprimés.

Littérature

- 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 suivantes.
- C. Cimbura, R. C. Gupta
J. Forensic Sci. 10 (1965) 228 suivantes.
- D. J. Berry
Clin. Chim. Acta 32 (1971) 235 suivantes.
- 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 suivantes.
- M. A. Brooks
Bioelectrochem. Bioenergetics 10 (1983) 37 suivantes.
- W. F. Smyth, M. R. Smyth, J. A. Groves, S. B. Tan
Analyst 103 (1978) 497 suivantes.

- J. Volke
Polarographic and voltammetric methods in pharmaceutical chemistry and pharmacology
Bioelectrochem. Bioenergetics 10 (1983) 7 suivantes.
- H. Oelschläger
Polarographic analysis of psychotropic drugs
Bioelectrochem. Bioenergetics 10 (1983) 25 suivantes.

```

===== 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	ADJ 2E			
10	END			

```

Method: Diazdet          SEGMENT
                          diaz
    
```

	Instructions	t/s	Main parameters	Auxiliary parameters
1	<REP			
2	ØPURGE			
3	ØSTIR			
4	ØME			
5	DPMODE		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

Fig. 1: Méthode pour la détermination polarographique du diazépam dans des comprimés (réalisée avec le VA Trace Analyzer 693): «Operation Sequence», Segment et Documentation.

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	

Fig. 2: Méthode (suite): Substances et Calcul.

```

===== 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	

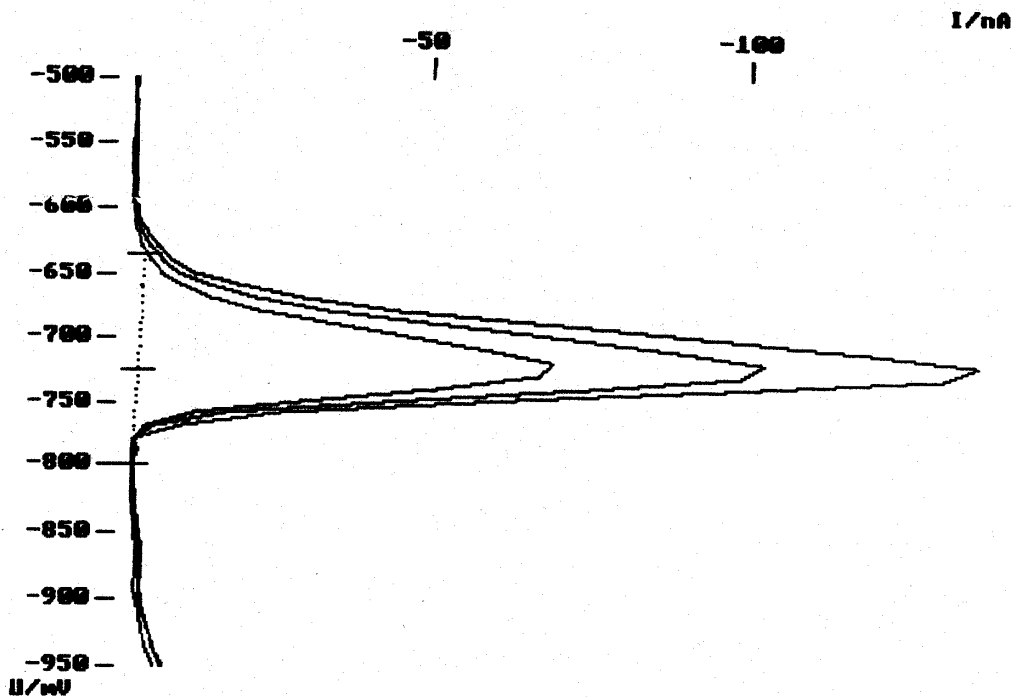
C# Workg.com.var Remark

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

Fig. 3: Rapport complet pour la détermination du diazépam dans des comprimés.

```

===== 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

Fig. 4: Polarogrammes pour la détermination du diazépam dans des comprimés.

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

Fig. 5: Rapport complet pour la détermination du diazépam dans du sang.

===== 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

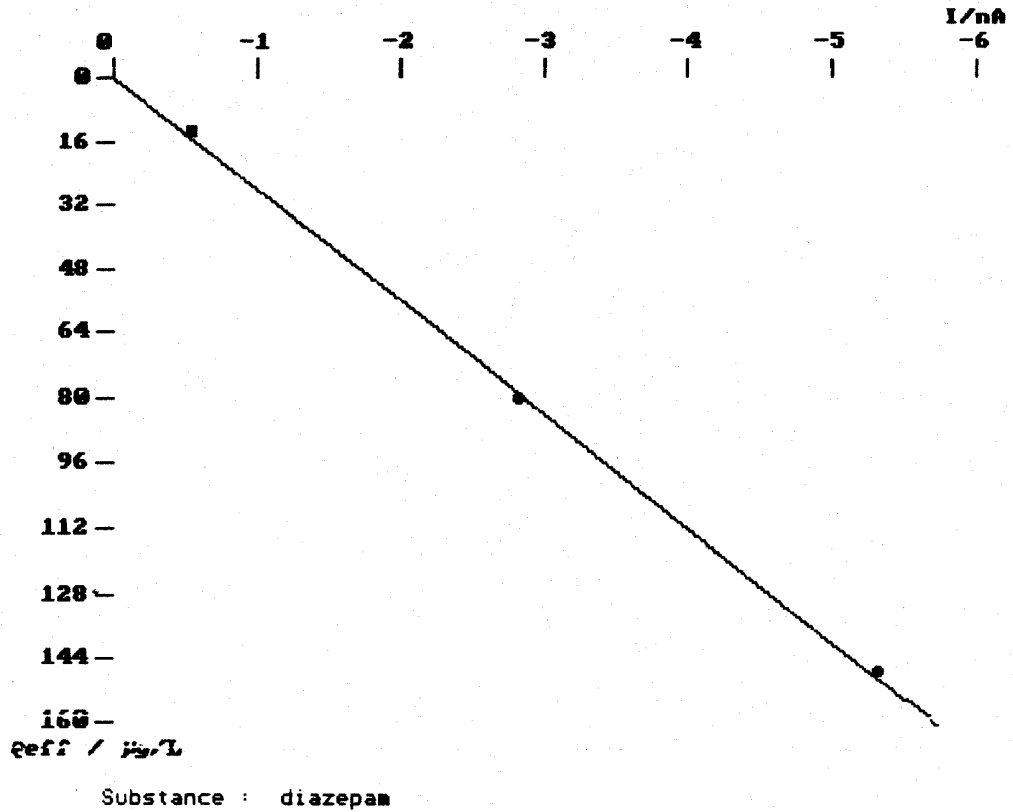


Fig. 6: Courbe des additions standards pour la détermination du diazépam dans du sang.