

# VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA INDICATIVA DE ESTABILIDADE PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR E IMPUREZAS DE DIAZEPAM POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA

Recebido em 03/09/2015

Aceito para publicação em 10/09/2015

Servidor Civil Arthur M Mendes <sup>1</sup>  
1ºTen (RM2-S) Erika Bachini Fonseca <sup>2</sup>  
CB-PC Norma Santos <sup>3</sup>  
CF (RM1-S) Marco Antônio Arruda <sup>4</sup>

## RESUMO

O Diazepam é um fármaco tranquilizante, amplamente prescrito no mundo. Devido ao seu uso crescente, verifica-se a necessidade de um controle de qualidade rigoroso das suas formas farmacêuticas para garantir sua eficácia e segurança. Muitos métodos têm sido propostos, porém a maioria é aplicável a determinação de diazepam e seus metabólitos em plasma sanguíneo. Neste trabalho propusemos a conversão do método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) descrito na Farmacopéia Brasileira para cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) para a determinação quantitativa de diazepam e seus produtos de degradação em comprimidos utilizando condições isocráticas com vazão de 0,3 mL/min de fase móvel em coluna cromatográfica C18 de 50mm x 2,0mm com tamanho de partícula de 1,6µm acondicionada a 30 ± 2°C. A fase móvel consistiu de uma mistura contendo metanol:acetonitrila:água (35:35:30) e o volume das injeções foi de 1,4µL e comprimento de onda de 254 nm. O método foi validado em duas faixas de trabalho correspondente à determinação de teor (20µg/mL) e impurezas (2µg/mL) quanto à seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e estabilidade das soluções amostra e padrão. Os comprimidos foram submetidos a diferentes condições de estresse, tais como degradação por íons metálicos, térmica, fotolítica, oxidativa hidrólise ácida/básica, exposição à umidade e verificada sua especificidade. O método validado é indicativo de estabilidade, simples, rápido, reprodutível e confiável, podendo ser empregado na rotina do laboratório de controle de qualidade.

**Palavras-chave:** Cromatografia; Diazepam.

## INTRODUÇÃO

Diazepam é um fármaco tranquilizante da classe dos benzodiazepínicos com propriedades anticonvulsivante, sedativa e relaxante muscular, amplamente prescrito para o tratamento de quadros agudos de ansiedade, crises convulsivas e como sedativo para cirurgias.<sup>1-2</sup>

O diazepam apresenta-se como pó cristalino bege ou amarelado, praticamente inodoro e estável na presença do ar. Deve ser conservado ao abrigo da luz. Solubilidade: 1 g em 333 mL de água, 16 mL de álcool, 2 mL de clorofórmio ou 39 mL de éter.<sup>3</sup>

A eficácia e segurança dos medicamentos são garantidas pela qualidade, sendo esta controlada por uma série de testes analíticos e especificações ao longo e ao final do processo de produção. Portanto, a utilização de metodologias analíticas confiáveis e eficazes torna-se imprescindível para o controle de qualidade dos medicamentos comercializados. Para garantir que um método de análise gere resultados confiáveis, ele deve ser avaliado por estudos experimentais demonstrando que é apropriado para a finalidade pretendida.<sup>4-5</sup>

Devido à necessidade de separação de múltiplos componentes durante a análise de amostras de estabilidade, os métodos cromatográficos têm precedência sobre os métodos convencionais de análise.<sup>6</sup>

De acordo com o guia do órgão regulatório dos Estados Unidos, o Food and Drug Administration (FDA), o método indicativo de estabilidade é definido como "procedimento analítico validado de quantificação que pode detectar as mudanças nas propriedades da substância ativa e do produto ao longo do tempo. O método indicativo de estabilidade quantifica exatamente a substância ativa sem a interferência de produtos de degradação, impurezas de processo, excipientes ou outras impurezas potenciais."<sup>6-7</sup>

Os avanços tecnológicos realizados no desempenho das partículas químicas, na otimização do sistema, no desenho do detector e no processamento de dados e controle, permitiram que a cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) apresentasse melhorias nas condições cromatográficas mantendo os princípios e praticidade da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Essas melhorias são consequência da utilização de tamanho de partículas menores que 2mm, fases móveis com altas velocidades lineares e pressões mais

<sup>1</sup> Técnico de Laboratório do Laboratório Farmacêutico da Marinha.

<sup>2</sup> Farmacêutica. Encarregada das Divisões de Prospecção Tecnológica e Propriedade Intelectual do Laboratório Farmacêutica da Marinha.

<sup>3</sup> Auxiliar da Divisão de Estabilidade do Laboratório Farmacêutico da Marinha.

<sup>4</sup> Farmacêutico. Encarregado da Divisão de Estabilidade do Laboratório Farmacêutico da Marinha.

elevadas resultando num aumento dramático de resolução, sensibilidade e velocidade de análise.<sup>8</sup>

Diversos métodos analíticos encontram-se disponíveis na literatura para a determinação de benzodiazepínicos (BDZs) e seus metabólitos em fluidos biológicos. Porém, raramente, esses métodos são aplicáveis para a determinação e quantificação de BDZs em formulações farmacêuticas.<sup>9-15</sup>

O método foi validado de acordo com os requisitos da resolução RE nº 899, Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, de 29 de maio de 2003. Os seguintes parâmetros foram avaliados: linearidade, exatidão, precisão, robustez, estabilidade das soluções padrão e amostra e seletividade através dos testes de degradação forçada. Este artigo apresenta a conversão do método descrito na farmacopéia brasileira por CLAE para CLUE indicativo de estabilidade, sensível, seletivo, rapidez e de baixo custo para ser utilizado na rotina de controle de qualidade de comprimidos de diazepam.<sup>16</sup>

## MÉTODO

### Materiais e reagentes

Os solventes utilizados apresentavam grau de qualidade para análise em HPLC. A acetonitrila e o metanol utilizados foram adquiridos da empresa J.T Baker®, EUA. O ácido clorídrico, hidróxido de sódio, peróxido de hidrogênio 30% e o sulfato cúprico apresentavam grau PA da empresa Vetec®, Brasil. A água foi purificada por sistema Milli-Q (Millipore System, Suíça). Todos os reagentes e soluções foram filtrados por membrana de celulose regenerada 0.45µm de poro. O padrão de referência foi adquirido do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS, Brasil) e os comprimidos produzidos pelo Laboratório Farmacêutico da Marinha (LFM, Brasil).

### Equipamentos e instrumentos utilizados

Foi utilizado um sistema de CLAE/CLUE Shimadzu Nexera X2 equipado com detector de arranjo de diodos modelo SPD-M20A, autoamostrador refrigerado modelo SIL-30AC, integrador modelo CBM-20A e bomba modelo LC-30AD. Os sinais adquiridos foram monitorados e processados pelo software Lab Solutions.

Outros equipamentos e instrumentos tais como balança analítica ATX-224 (Shimadzu, Japão), pHmetro (Luca, Brasil), ultrassom (Quimis, Brasil), estufa (Venticell, Brasil), e purificador de água foram utilizados para o preparo dos padrões e amostras e também para o teste de degradação forçada.

### Condições cromatográficas

As análises foram realizadas em condições isocráticas com vazão da fase móvel de 0,3 mL/min. de fase móvel em coluna cromatográfica Shim-pack XR-ODS III (Shimadzu, Japão) C18 de 50mm x 2mm com tamanho de partícula de 1,6µm acondicionada a 30 ± 2°C. A fase móvel consistiu de uma mistura contendo metanol:acetonitrila:água (35:35:30) e o volume das injeções foi de 1,4 µL. As amostras foram monitoradas no comprimento de onda de 254 nm.

### Preparo das soluções

As soluções padrões foram preparadas utilizando a fase móvel como diluente, pesadas e diluídas para a concentração de 20 µg/mL para a determinação do teor, 2 µg/mL para a determinação

dos produtos de degradação e 1 µg/mL para verificação do limite de quantificação.

As amostras da formulação foram preparadas a partir do pó triturado de 20 comprimidos de diazepam, pesadas e solubilizadas utilizando a fase móvel como diluente e diluídas para a concentração de 20 µg/mL para a determinação do teor e 1000 µg/mL para a determinação dos produtos de degradação. As soluções foram sonicadas e filtradas em membrana 0,45µm antes de injetadas.

### Procedimento analítico e verificação da adequação do sistema

As soluções foram injetadas, separadamente, conforme as condições cromatográficas estabelecidas. A verificação da adequação do sistema foi avaliada, previamente a cada avaliação do parâmetro de validação, por meio do cálculo do desvio padrão relativo de 06 (seis) réplicas das injeções das soluções padrão, além da determinação do fator de cauda ou assimetria, resolução entre o diazepam e os possíveis produtos de degradação e eficiência da coluna.

### Teste de degradação forçada

O teste de estresse foi planejado para investigar a seletividade e a propriedade indicativa de estabilidade do método. Os pós correspondentes ao ativo, o placebo e a formulação foram submetidos aos testes de estresse em solução nas condições ácida, básica, oxidativa, exposição aos íons metálicos e no estado sólido nas condições térmica, fotolítica e de exposição à umidade. As soluções foram preparadas por solubilização dos pós no diluente e tratadas com solução de ácido clorídrico 0,01M, hidróxido de sódio 0,2M e peróxido de hidrogênio 1%. Para o teste de degradação térmica, os pós foram aquecidos a 80°C por um período de 1, 2, 3 e 24 horas. Para o teste de degradação fotolítica, os pós foram expostos à fonte de UV totalizando 3600000 lux. Para o teste de exposição à umidade as amostras foram acondicionadas em câmaras climáticas ajustadas a 40° C e 75% de umidade relativa. Após as exposições, as amostras foram solubilizadas e diluídas na concentração de trabalho e injetadas sob as condições cromatográficas estabelecidas pela metodologia. As amostras submetidas aos testes de estresse foram quantificadas e comparadas aos resultados das amostras controle. A pureza de pico foi estabelecida utilizando detector de arranjo de fotodiodos. O balanço de massa das amostras degradadas foi realizado para correlacionar a perda do ativo e o aumento da quantidade de produtos de degradação.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia de quantificação do teor de diazepam por HPLC da farmacopéia brasileira foi utilizada como base para definir as condições cromatográficas da metodologia por UPLC.

### Verificação da adequação do sistema

Os parâmetros de adequação de sistema obtidos das 06 (seis) réplicas das injeções das soluções padrão apresentaram resultados satisfatórios a cada parâmetro, tais como fator de cauda não mais que 2,0, eficiência de coluna maior que 2000 e desvio padrão relativo máximo de 2,0%. O tempo de retenção do diazepam foi de 1,83 minutos ± 20%.

**Tabela 1:** Resultados do teste de degradação forçada.

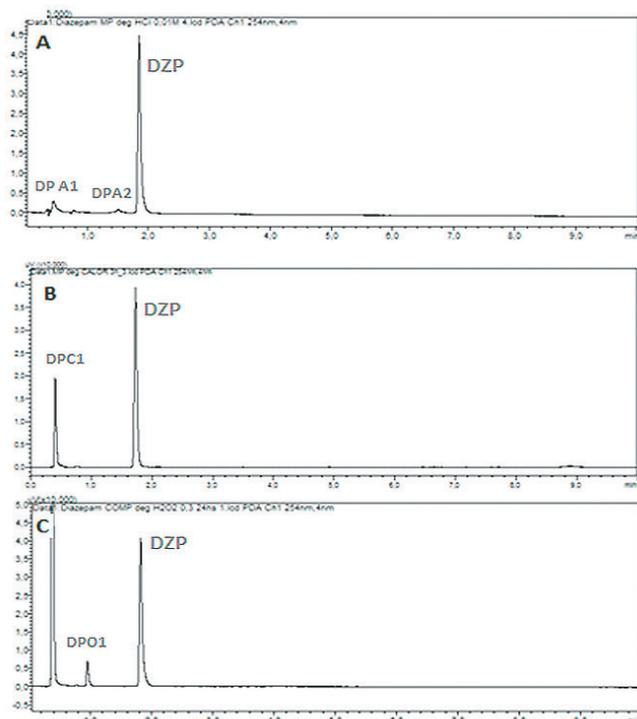
Condição	% degradado		Índice de pureza		Threshold	
	Formulação	Matéria-prima	Formulação	Matéria-prima	Formulação	Matéria-prima
Hidrólise ácida (HCl 0,01M)	13,78	13,89	1,0000	1,0000	0,9986	0,9988
Hidrólise alcalina (NaOH 0,2M)	17,87	18,57	1,0000	1,0000	0,9963	0,9998
Oxidação (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,3%)	12,41	12,04	1,0000	1,0000	0,9997	0,9996
Umidade (75%/40°C)	21,89	9,8	1,0000	1,0000	0,9991	0,9997
Íons metálicos (CuSO <sub>4</sub> 0,03M)	9,71	2,63	1,0000	1,0000	0,9987	0,9982
Calor seco (80°C)	10,11	24,11	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999
Foto (254nm)	-2,76	-3,02	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999

### Validação

A validação da metodologia analítica contemplou duas faixas de trabalho: 20 µg/mL para a análise de teor e 2 µg/mL para a análise de impurezas.

### Seletividade

Os resultados dos testes de estresse revelaram que os produtos de degradação foram bem resolvidos do ativo, apresentando valores de pureza de pico (diferença entre o ângulo de pureza e o limiar de pureza) equivalentes à 1,000 provando a homogeneidade do pico. Os resultados estão reportados na (Tabela 1).



**Figura 1:** Cromatogramas representativos do teste de estresse A-condição ácida, B-condição térmica C-condição oxidativa.

### Linearidade

A linearidade do método foi determinada através da correlação entre a concentração e a resposta do diazepam obtida nas faixas de 14 µg/mL a 26 µg/mL e 0,5 µg/mL a 10 µg/mL correspondente às faixas de determinação do teor e impureza, respectivamente, conforme demonstrado nas (Tabelas 2 e 3 e Figuras 1-4). Os dados foram tratados estatisticamente seguindo o modelo de regressão linear.<sup>4,16</sup>

Através dos resultados demonstrados, verifica-se que as faixas de trabalho de teor e impurezas possuem correlação linear e os resíduos encontram-se distribuídos aleatoriamente no intervalo de duas vezes o erro padrão.

**Tabela 2:** Resultado da linearidade na faixa de trabalho de determinação de impurezas.

Faixa (%)	Concentração média (µg/mL)	Área média
0,05	0,54	4543
0,1	1,08	8402
0,2	2,16	17438
0,4	4,32	35424
0,8	8,64	69840
1,0	10,80	86513
	<b>Inclinação</b>	<b>8114,74</b>
	<b>Interseção</b>	<b>-256,20</b>
	<b>y - Intercepto (%)</b>	<b>1,41</b>
	<b>r</b>	<b>0,999</b>
	<b>r<sup>2</sup></b>	<b>0,999</b>
	<b>2 x Erro Padrão</b>	<b>1701,98</b>
	<b>Observações</b>	<b>18</b>

**Tabela 3:** Resultado da linearidade na faixa de trabalho de determinação do teor.

Faixa (%)	Concentração média (µg/mL)	Área média
70	15,49	123961
80	17,71	142010
90	19,92	160726
100	22,13	179531
110	24,35	193269
120	26,56	212900
130	28,77	230085
	<b>Inclinação</b>	<b>8015,96</b>
	<b>Interseção</b>	<b>104,08</b>
	<b>y - Intercepto (%)</b>	<b>0,06</b>
	<b>r</b>	<b>0,999</b>
	<b>r<sup>2</sup></b>	<b>0,998</b>
	<b>2 x Erro Padrão</b>	<b>3220,80</b>
	<b>Observações</b>	<b>21</b>

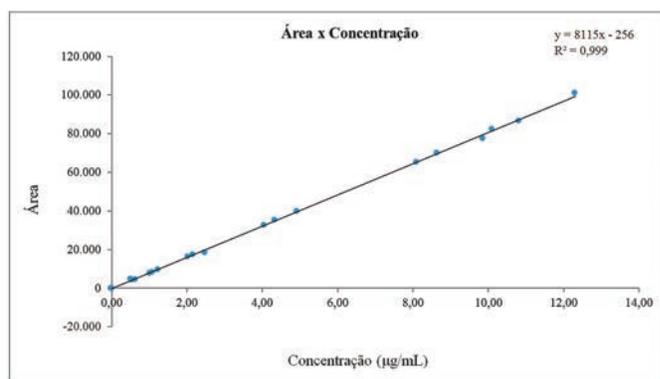


Figura 2: Gráfico da linearidade na faixa de trabalho de determinação do teor.

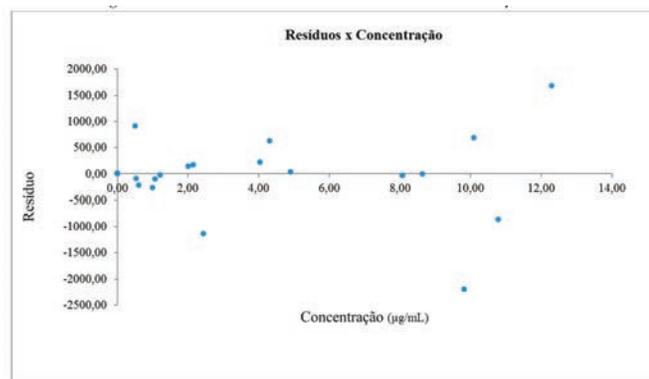


Figura 3: Gráfico de resíduos da linearidade na faixa de trabalho de determinação do teor.

### Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação, 0,127 µg/mL e 0,381 µg/mL respectivamente, foram determinados a partir das curvas obtidas no teste de linearidade na faixa de trabalho de determinação de impurezas (2 µg/mL).

### Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas em três níveis de concentração. A exatidão foi determinada através da porcentagem de recuperação do analito em cada amostra e apresentou resultados menores que o valor especificado de 5% para a faixa de teor e 10% para a faixa de impurezas.<sup>4,16</sup> Os resultados da precisão foram expressos em porcentagem de desvio padrão relativo entre as respostas de cada nível de concentração, sendo estes menores que 5% para a faixa de teor e 10% para a faixa de impurezas.<sup>4,16</sup> Os resultados estão demonstrados nas (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4: Resultados do teste de precisão e exatidão da análise de impurezas.

Concentração%	Concentração mg/mL	% de recuperação (média, n=3)			
		Analista A		Analista B	
		Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
0,05	0,5	96,7	97,7	98,3	94,8
0,2	2,0	100,6	99,1	102,5	100,1
1,0	10,0	103,0	102,8	105,9	102,7
	<b>Média</b>	<b>100,1</b>	<b>99,9</b>	<b>102,2</b>	<b>99,2</b>
	<b>% DPR</b>	<b>3,1</b>	<b>2,6</b>	<b>3,8</b>	<b>4,0</b>

Tabela 5: Resultados do teste de precisão e exatidão da análise de teor.

Concentração %	Concentração mg/mL	% de recuperação (média, n=3)			
		Analista A		Analista B	
		Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
70	0,014	97,3	101,7	100,9	96,2
100	0,020	98,4	98,6	101,0	98,8
130	0,026	97,0	100,1	97,8	97,8
	<b>Média</b>	<b>97,6</b>	<b>100,2</b>	<b>99,9</b>	<b>97,6</b>
	<b>% DPR</b>	<b>0,8</b>	<b>1,5</b>	<b>1,8</b>	<b>1,3</b>

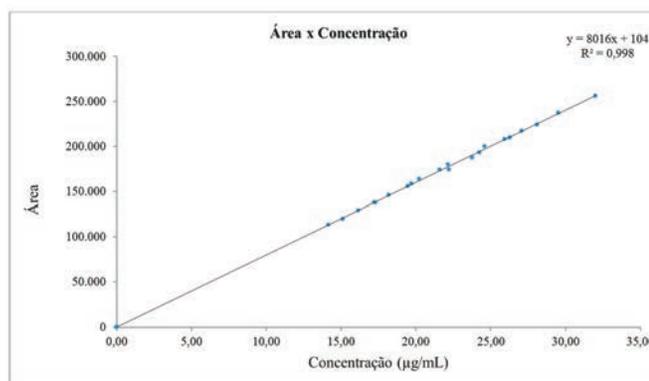


Figura 4: Gráfico da linearidade na faixa de trabalho de determinação do teor.

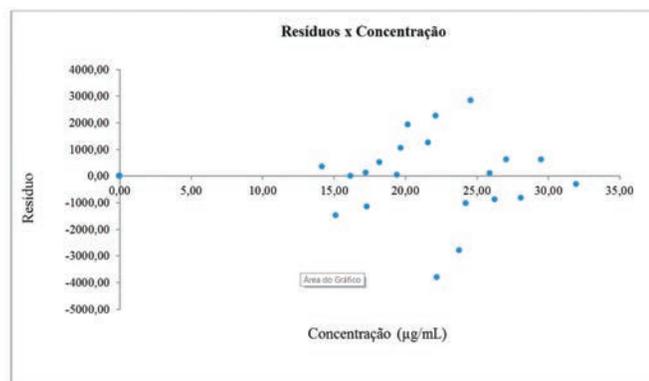


Figura 5: Gráfico de resíduos da linearidade na faixa de trabalho de determinação do teor.

### Precisão Intermediária

A precisão do método foi avaliada em três níveis de concentração através da porcentagem de recuperação do analito em cada amostra, realizada por analistas diferentes no mesmo dia e entre dias diferentes. Os resultados da precisão intermediária foram expressos em porcentagem de desvio padrão relativo entre as respostas de cada nível de concentração. A partir dos resultados demonstrados nas (Tabelas 6 e 7) verifica-se que estes foram menores que o valor especificado de 5% para a faixa de teor e 10% para determinação de impurezas.<sup>4,16</sup> Foi verificado que não há diferenças entre as análises dos analistas A e B através da análise estatística de homogeneidade das variâncias (Teste F,  $F_{calc} < F_{tab}$ ).

**Tabela 6:** Resultados do teste F da análise de impurezas.

	Dias 1 e 2 Analista A	Dias 1 e 2 Analista B	Dia 1 Analistas A e B	Dias 1 e 3 Analistas A e B
Fcalc	2,4	3,1	2,4	3,0
Ftab	3,4	3,4	3,4	3,4

**Tabela 7:** Resultados do teste F da análise de teor.

	Dias 1 e 2 Analista A	Dias 1 e 2 Analista B	Dia 1 Analistas A e B	Dias 1 e 3 Analistas A e B
Fcalc	2,4	3,1	2,4	3,0
Ftab	3,4	3,4	3,4	3,4

## Robustez

A robustez foi avaliada através das recuperações do analito obtidas das soluções padrão e amostra injetadas em condições cromatográficas alteradas, tais como fluxo, lote da coluna, temperatura do forno e composição da fase móvel.<sup>4,16</sup>

**Tabela 8:** Resultado da robustez na faixa de trabalho.

Condição	Recuperação (%)	Desvio
Normal	100,9	-
Coluna	101,0	0,1
Temperatura 35°C	100,3	0,6
Temperatura 25°C	100,6	0,3
Fase Móvel (+1%)	100,4	0,5
Fase Móvel (-1%)	100,3	0,6
Fluxo (1,1ml/min)	100,3	0,6
Fluxo (0,9ml/min)	100,3	0,6

## Estabilidade das soluções

Para determinar a estabilidade das soluções, as soluções amostra e padrão foram preparadas e analisadas imediatamente e em intervalos de tempo diferentes totalizando um período de 48 horas.<sup>4,16</sup> Os resultados indicaram que as soluções padrão e amostra são estáveis à temperatura ambiente até 48 horas.

**Tabela 9:** Resultados do teste de estabilidade das soluções.

Varição	0hs	6hs	12hs	24hs	36hs	48hs
Solução padrão	-	0,7	0,4	0,1	0,5	0,5
Solução amostra	-	0,3	1,2	1,8	3,2	4,2

## CONCLUSÃO

O método por CLUE apresentado é simples, rápido, indicativo de estabilidade e reprodutível. Os resultados obtidos na validação indicam especificidade, linearidade, precisão, exatidão e confiabilidade para a determinação do teor de diazepam e seus produtos de degradação em comprimidos. As principais vantagens deste método consideradas foram a economia de solvente, menor tempo de execução, modo isocrático de eluição e facilidade da preparação da amostra, podendo, portanto ser recomendado para rotina de controle de qualidade.

## REFERÊNCIAS

- Rang H, Dale MM, Ritter JM. Farmacologia. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004.
- Gilman AG. As bases farmacológicas da terapêutica. 1ª ed. São Paulo: Artmed; 2006.
- Martindale W. The complete drug reference. 33ª ed. London: Pharmaceutical Press; 2002.
- Ermer J, Miller JH. Method validation in pharmaceutical analysis. 1ª ed. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2005.
- Quality assurance of pharmaceuticals: a compendium of guidelines and related materials. A good manufacturing practices and inspection. 2nd ed. Geneva: WHO; 2007. V.2.
- Bakshi M, Singh S. Development of validated stability indicating assay methods: critical review. J Pharm Biomed Anal. 2002 Jun;28(6):1011-40.
- Guidance for Industry: analytical procedures and methods validation (draft guidance). Rockville, MD: FDA; 2000.
- Swartz ME. UPLC: an introduction and review. J Liq Chromatogr Relat Technol 2005;28:7-8.
- Szatkowska P, Koba M, Koslinski P, Wandas J, Baczek T. Analytical methods for determination of benzodiazepines: a short review. Eur J Chem. 2014;12(10):994-1007.
- Rouini M, Ardakani Y, Moghaddam K, Solatani F. An improved HPLC method for rapid quantitation of diazepam and its major metabolites in human plasma. Talanta. 2008 May;75(3):671-6.
- Samanidou VF, Pechlivanidou AP, Papadoyannis IN. Development of a validated HPLC method for the determination of four 1,4-benzodiazepines in human biological fluids. J Sep Sci. 2007 Mar;30(5):679-87.
- Nudelmam NS, Waisbaum G. Isolation and structure elucidation of novel products of the acidic degradation of diazepam. J Pharm Sci. 1995 Feb;84(2):208-11.
- Chiba K, Horn H, Chiba T, Kato Y, Hirano T, Ishizaki T. A development and preliminary application of high-performance liquid chromatographic assay of urinary metabolites of diazepam in humans. J Chromatogr. 1995;668:77-84.
- Hewala II. GLC and HPLC determination of diazepam and its degradation products in pharmaceutical formulations. Analytical Letters. 1992;25(10):1877-1905.
- Smitha FM, Nuessle NO. HPLC method for determination of diazepam injection. Analytical Letters. 1982;15(4):363-71.
- Brasil. Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos; fica revogada a Resolução RE n. 475, de 19 de março de 2002. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília (DF) 2003 jun. 02; Sec.1, (104):56-9.

**Como citar este artigo:** Mendes AM, Fonseca EB, Santos N, Aruda MA. Validação de metodologia indicativa de estabilidade para determinação do teor e impurezas de diazepam por cromatografia líquida de ultra eficiência. Arq Bras Med Naval. 2015 jan/dez;76(1):44-48.

# VALIDATION OF A STABILITY INDICATING UPLC METHOD FOR ASSAY AND IMPURITY DETERMINATION OF DIAZEPAM IN TABLETS

Received on 9/3/2015

Accepted for publication on 9/10/2015

Federal Employee Arthur M Mendes <sup>1</sup>  
1°Ten (RM2-S) Erika Bachini Fonseca <sup>2</sup>  
CB-PC Norma Santos <sup>3</sup>  
CF (RM1-S) Marco Antônio Arruda <sup>4</sup>

## ABSTRACT

Diazepam is a tranquilizer drug widely prescribed worldwide. Due to its increased use, quality control of its pharmaceutical dosage forms is needed to ensure their effectiveness and safety. Many methods have been proposed, but most are applicable to the determination of diazepam and its metabolites in blood plasma. In the present study we proposed a HPLC/UPLC conversion of analytical method described in the Brazilian Pharmacopoeia for quantitative determination of diazepam and its degradation products in tablets under isocratic conditions with a flow rate of 0.3 mL/min, a C18 chromatographic column 50mm x 2.1mm with 3 µM particle size conditioned at 30 ± 2°C. The mobile phase consisted of a mixture of methanol: acetonitrile: water (35:35:30), the injection volume was 1.4 µL and wavelength of 254 nm. Two works range were validated: assay (20 µg/mL) and impurities (2 µg/mL) and the selectivity, linearity, precision, accuracy, robustness and sample and standard stability solutions were. The tablets were subjected to different stress conditions, such as degradation by metal ions, thermal, photolytic, oxidative acid/alkali hydrolysis and exposure to moisture and checked his specificity. The validated method is indicative of stability, simple, rapid, reproducible and reliable and can be used in routine quality control laboratory.

**Keywords:** *Chromatography; Diazepam.*

## INTRODUCTION

Diazepam is a tranquilizer drug of the class of benzodiazepine with anticonvulsant, sedative and muscle relaxant properties, widely prescribed for the treatment of acute episodes of anxiety, seizures, and sedatives for surgery.<sup>1,2</sup>

Diazepam is yellowish or beige crystalline powder, practically odorless and stable in the presence of air. It must be kept away from light. Solubility: 1 g in 333 mL of water, 16 ml of ethanol, 2 ml of chloroform and 39 ml of ether.<sup>3</sup>

The efficacy and safety of drugs are guaranteed for quality, which is controlled by a number of analytical tests and specifications during and after the production process. Therefore, the use of reliable and effective analytical methods it is essential for the quality control of marketed medicines. To ensure that a method of analysis generates reliable results, it should be evaluated by experimental studies demonstrating that is suitable for the intended purpose.<sup>4,5</sup>

Because of requirement of separation of multiple components during analysis of stability samples, chromatographic methods have taken precedence over the conventional methods of analysis.<sup>6</sup>

According to an FDA guidance, a stability-indicating method is a validated quantitative analytical procedure that can detect the changes with time in the pertinent properties of the drug substance and drug product. A stability-indicating method accurately measures the active ingredients, without interference from degradation products, process impurities, excipients, or other potential impurities.<sup>6,7</sup>

The technological strides made in particle chemistry performance, system optimization, detector design, data processing and control, allowed ultra performance liquid chromatography (UPLC) to show improvement in chromatographic performance while retains the practicality and principles of high performance liquid chromatography (HPLC). Using sub-2 mm particles, mobile phases at high linear velocities and instrumentation that operates at higher pressures, dramatic increases in resolution, sensitivity, and speed of analysis can be obtained.<sup>8</sup>

<sup>1</sup> Laboratory Technician of the Navy Pharmaceutical Laboratory.

<sup>2</sup> Pharmacist. Responsible for the Divisions of Technology Foresight and Intellectual Property of the Navy Pharmaceutical Laboratory.

<sup>3</sup> Auxiliary Stability Division of the Navy Pharmaceutical Laboratory

<sup>4</sup> Pharmacist. Responsible of the Stability Division of the Navy Pharmaceutical Laboratory.

A few methods for the determination of benzodiazepines and his metabolites in human plasma appear in literature. So far no systematic UPLC method has been reported for determination of Diazepam in pharmaceutical formulations.<sup>9-15</sup>

The method was validated according requirements listed under specific Brazilian legislation Guide for validation of analytical and bioanalytical methods number 899 from 2003 may 29<sup>th</sup>. The following parameters were performed such as linearity, accuracy, precision, ruggedness, sample and standard solution stability and forced degradation tests. This paper reports a sensitive, selective, fast, low cost and indicative-stability UPLC method with UV detection adapted from a HPLC method described in brazilian pharmacopoeia, useful for quality control routine of diazepam in pharmaceutical formulations.<sup>16</sup>

## METHOD

### Materials and reagents

Acetonitrile and methanol HPLC degree were purchased from JT Baker®, USA company. Hydrochloric acid, sodium hydroxide, hydrogen peroxide and 30 % cupric sulfate were analytical degree purchased from Vetec®, Brazil company De-ionized water of high purity was obtained from Milli-Q purification system, Swiss. All reagents and solutions were filtered through regenerated cellulose membrane with 0.45µm pore. The reference standard was acquired from INC-QS, Brazil and medicine manufactured by Brazilian Navy Pharmaceutical Laboratory.

### Equipment and instruments

Analysis were performed with the following HPLC/UPLC Shimadzu Nexera X2 system : a Model SPD-M20A diod array detector, a Model SIL-30AC autosampler, a Model CBM-20A integrator Shimadzu, a Model LC-30AD pump. The data were acquired and processed by Lab solutions chromatography software. Other instruments like Shimadzu, Japan Analytical Balance, Luca, Brazil pH Meter, Quimis, Brazil sonicator were used in sample and standard preparations and for forced degradation tests.

### Chromatographic conditions

The analyzes were carried out under isocratic conditions at a mobile phase flow rate of 0.3 ml / min run through C18 50mm x 2.1mm chromatographic column with 3 µm particle size conditioned at 30 ± 2 ° C . The mobile phase consisted of a mixture containing methanol: acetonitrile: water (35:35:30) and the volume of injection was 1.4 µL. The samples were monitored at a wavelength of 254 nm.

### Solution preparation

The standard solutions were prepared using the mobile phase as diluent, heighthed and diluted at concentration of 20 µg / ml for assay, 2 µg / mL for degradation product determination and 1 µg / mL for quantification limit verification. The sample of the formulation drug was prepared by powdering 20 tablets of diazepam weighed and solubilized using the mobile phase as diluent, and diluted to a concentration of 20 µg / ml for assay and 1000 µg / ml for the determination

of degradation products. The solutions were sonicated and filtered through a membrane 0,45µm before injected.

### Analytic procedure and system suitability

The solutions were injected separately according to established chromatographic conditions. System suitability is done by preparing and injecting the standard solution 6 times and calculating its RSD % before each validation test. The peak tailing or assymetry, resolution between diazepam and its possible degradation products and column efficiency are evaluated too.

### Stress testing

The stress test was planned to investigate the selectivity and stability indicating property of the method. The corresponding active, placebo and formulation powder were deliberately stressed in a solution state at metal ions exposure, acidic, alkaline and oxidation conditions, in solid state at thermal, photolytic and exposure to moisture conditions.

The solutions were prepared by solubilizing the powder in the diluent and treated with 0.01M hydrochloric acid solution, 0.2M sodium hydroxide and hydrogen peroxide 1 %.

For the thermal degradation test, the powders were heated at 80 ° C for a period of 1 , 2, 3 and 24 hours . For photolytic degradation test, the powders were exposed to the UV source totaling 3 600 000 lux. For humidity exposure test samples were placed in climate chambers adjusted to 40 ° C and 75 % relative humidity.

After exposure the samples were solubilized and diluted to the working concentration and injected under the chromatographic conditions established by the methodology.

The tests were quantified and the results compared to control samples. a photodiode array detector was used to establish peak purity. Mass balance of the degraded samples was carried out to correlate the loss of active and the increase in the amount of degradation products.

## RESULTS AND DISCUSSION

The HPLC assay method described in Brazilian Pharmacopoeia was used as a basis for defining the UPLC chromatographic conditions.

### System suitability

The system suitability criteria obtained from 06 (six ) injections of standard solutions showed satisfactory results in each test, such as: tailing factor no more than 2.0 , column efficiency greater than 20000, and relative standard deviation maximum of 2 0% . Diazepam retention time was 1.83 minutes ± 20 %.

### Validation

The analytical method validation included two work groups: 20 µg/mL for assay and 2 µg/mL for the analysis of impurities.

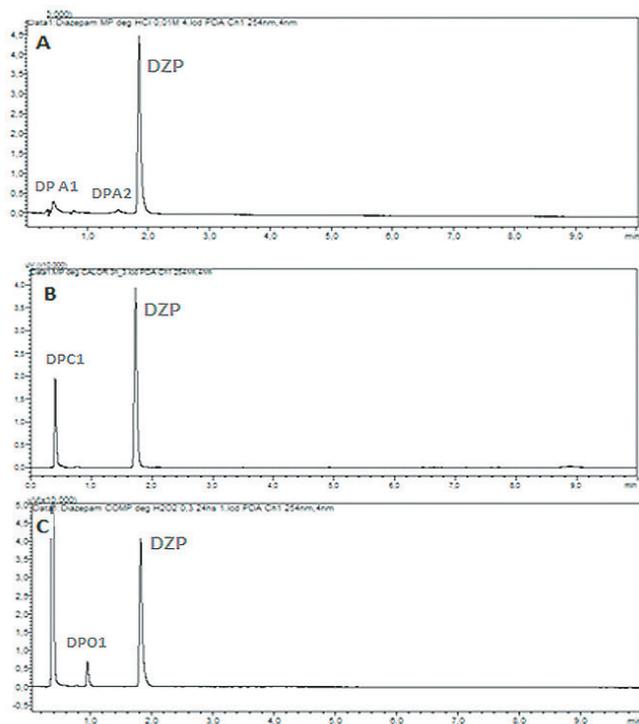
### Selectivity

The degradation tests showed that the degradation products were well separated from active and the peak purity data close

**Table 1: Stress testing results.**

Degradation condition	% degradation		Purity index		Threshold	
	Dosage form	API	Dosage form	API	Dosage form	API
Acid	13,78	13,89	1,0000	1,0000	0,9986	0,9988
Alkali	17,87	18,57	1,0000	1,0000	0,9963	0,9998
Peroxide	12,41	12,04	1,0000	1,0000	0,9997	0,9996
Umidity	21,89	9,8	1,0000	1,0000	0,9991	0,9997
Metalic ions	9,71	2,63	1,0000	1,0000	0,9987	0,9982
Heat	10,11	24,11	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999
Photolytic	-2,76	-3,02	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999

to 1,000 (purity angle less than purity threshold) proved the homogeneity of the peak of diazepam. The stress test results are given in (Table 1).



**Figure 1: Stress testing representative chromatograms A- acid condition, B- thermic condition C- oxidative condition.**

### Linearity

The method linearity was determined by correlation between concentration and response of diazepam obtained in range 14 µg/mL- 26 µg/mL for assay and 0,5 µg/mL- 10 µg/mL for impurity determination. Data were analyzed statistically using a linear regression model. The results reported in (Tables 2 and 3 and Figures 1- 4) is shown that the working ranges have a linear correlation and the residues are randomized distributives at twice the standard error range.

**Table 2: Linearity results at impurity determination range.**

Range (%)	Average concentration (µg/mL)	Area
0,05	0,54	4543
0,1	1,08	8402
0,2	2,16	17438
0,4	4,32	35424
0,8	8,64	69840
1,0	10,80	86513
Slope		8114,74
Intercept		-256,20
y - Intercept (%)		1,41
r		0,999
r2		0,999
2 x standard error		1701,98
Observations		18

**Table 3: Linearity results at assay range.**

Range (%)	Average concentration (µg/mL)	Area
70	15,49	123961
80	17,71	142010
90	19,92	160726
100	22,13	179531
110	24,35	193269
120	26,56	212900
130	28,77	230085
Slope		8015,96
Intercept		104,08
y - Intercept (%)		0,06
r		0,999
r2		0,998
2 x standard error		3220,80
Observations		21

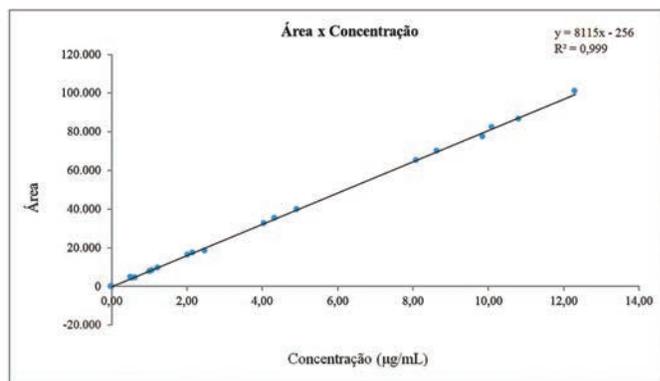


Figure 2: Linearity graphic at impurity determination range.

### Limite of detection and quantification

The detection and quantification limits, 0,127 µg/ml and 0,381 µg/ml respectively, were determined from working range (2µg/mL) of impurity determination linearity curves.

### Precision e accuracy

The method precision and accuracy were evaluated at three concentration levels. Accuracy was determined by percent recovery of analyte in each sample and showed results less than 5% for assay and 10% for impurity determination. Precision results were expressed as a percentage of relative standard deviation between responses of each concentration level and found to be less than 5% for assay and 10% for impurity determination. The results were reported in (Tables 4 and 7).

### Intermediate Precision

The method intermediate precision was evaluated at three levels of analyte concentration by percentage recovery for each sample and was carried out by different analyst between and different days. Intermediate precision result was expressed as a percentage of relative standard deviation between the responses of each concentration level. In (Tables 4 and 7) is shown that results are less than specified value of 5% for assay and 10% for impurity determination. There are no differences between the analysis of analysts A and B demonstrated by statistical analysis of homogeneity of variance (Teste F,  $F_{calc} < F_{tab}$ ).

Table 4: Precision and accuracy results at impurity determination range.

Concentration %	Concentration mg/mL	% de recovery (average, n=3)			
		Analyst A		Analyst B	
		Day 1	Day 2	Day 1	Day 2
0,05	0,5	96,7	97,7	98,3	94,8
0,2	2,0	100,6	99,1	102,5	100,1
1,0	10,0	103,0	102,8	105,9	102,7
	<b>Average</b>	<b>100,1</b>	<b>99,9</b>	<b>102,2</b>	<b>99,2</b>
	<b>% DPR</b>	<b>3,1</b>	<b>2,6</b>	<b>3,8</b>	<b>4,0</b>

### Robustness

The robustness was evaluated by analyte recoveries obtained from standard and sample solutions and injected into the modified chromatographic conditions such as flow rate, oven temperature, column batch and composition of the mobile phase.

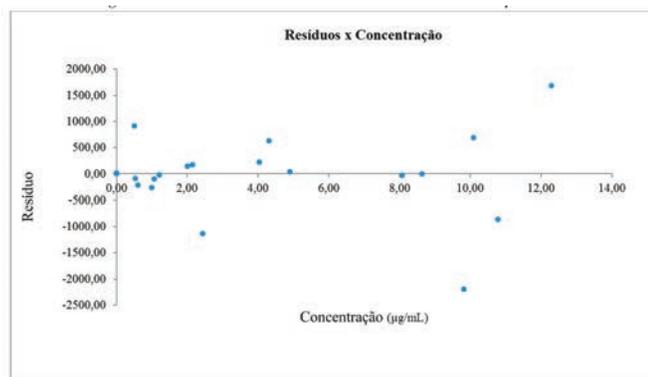


Figure 3: Linearity residuals graphic at impurity determination range.

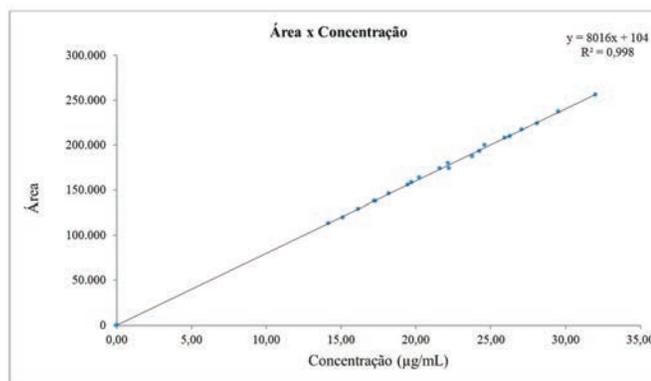


Figure 4: Linearity graphic at assay range.

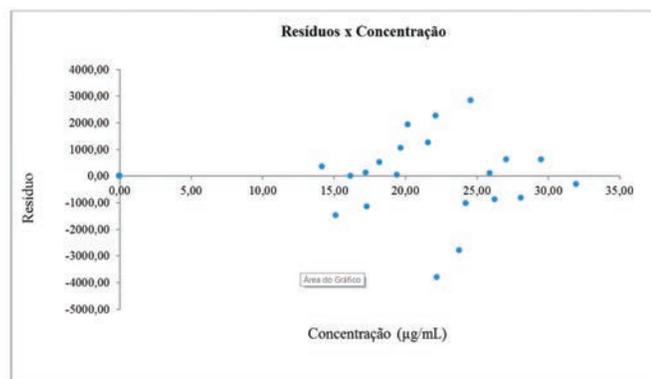


Figure 5: Linearity residuals graphic at impurity determination range.

Table 5: Precision and accuracy results at assay range.

Concentration %	Concentration mg/mL	% recovery (average, n=3)			
		Analyst A		Analyst B	
		Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
70	0,014	97,3	101,7	100,9	96,2
100	0,020	98,4	98,6	101,0	98,8
130	0,026	97,0	100,1	97,8	97,8
	<b>Average</b>	<b>97,6</b>	<b>100,2</b>	<b>99,9</b>	<b>97,6</b>
	<b>% RSD</b>	<b>0,8</b>	<b>1,5</b>	<b>1,8</b>	<b>1,3</b>

**Table 6:** Test F results at impurity determination range.

	Days 1 e 2 Analyst A	Days 1 e 2 Analyst B	Day 1 Analysts A and B	Days 1 e 3 Analysts A and B
Fcalc	2,4	3,1	2,4	3,0
Ftab	3,4	3,4	3,4	3,4

**Table 7:** Test F results at assay range.

	Days 1 e 2 Analyst A	Days 1 e 2 Analyst B	Day 1 Analysts A and B	Days 1 e 3 Analysts A and B
Fcalc	2,4	3,1	2,4	3,0
Ftab	3,4	3,4	3,4	3,4

**Table 8:** Robustness results at assay range.

Condition	Recovery (%)	Deviation
Normal	100,9	-
Column	101,0	0,1
Temperature 35°C	100,3	0,6
Temperature 25°C	100,6	0,3
Mobile Phase (+1%)	100,4	0,5
Mobile Phase (-1%)	100,3	0,6
Flow (1,1ml/min)	100,3	0,6
Flow (0,9ml/min)	100,3	0,6

### Stability of Solution

To determine the solution stability, sample and standard solutions were prepared, analyzed immediately and after different time intervals up to 48 hrs. The results indicated that standard and sample solutions were stable at room temperature up to 48 hrs.

**Table 9:** Solutions Stability results.

Deviation	0hs	6hs	12hs	24hs	36hs	48hs
Standard solution	-	0,7	0,4	0,1	0,5	0,5
Sample solution	-	0,3	1,2	1,8	3,2	4,2

### CONCLUSION

The reported CLUE method is simple, fast, stability indicating and reproducible. The validation results indicate specificity, linearity, precision, accuracy and reliability for the determination of diazepam content and degradation products in tablet form. The main advantages of this method were considered the solvent savings, shorter execution time, isocratic elution and ease of sample preparation and can therefore be recommended for routine quality control.

### REFERENCES

1. Rang H, Dale MM, Ritter JM. Farmacologia. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004.
2. Gilman AG. As bases farmacológicas da terapêutica. 1ª ed. São Paulo: Artmed; 2006.
3. Martindale W. The complete drug reference. 33ª ed. London: Pharmaceutical Press; 2002.
4. Ermer J, Miller JH. Method validation in pharmaceutical analysis. 1ª ed. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2005.
5. Quality assurance of pharmaceuticals: a compendium of guidelines and related materials. A good manufacturing practices and inspection. 2nd ed. Geneva: WHO; 2007. V.2.
6. Bakshi M, Singh S. Development of validated stability indicating assay methods: critical review. J Pharm Biomed Anal. 2002 Jun;28(6):1011-40.
7. Guidance for Industry: analytical procedures and methods validation (draft guidance). Rockville, MD: FDA; 2000.
8. Swartz ME. UPLC: an introduction and review. J Liq Chromatogr Relat Technol 2005;28:7-8.
9. Szatkowska P, Koba M, Koslinski P, Wandas J, Baczek T. Analytical methods for determination of benzodiazepines: a short review. Eur J Chem. 2014;12(10):994-1007.
10. Rouini M, Ardakani Y, Moghaddam K, Solatani F. An improved HPLC method for rapid quantitation of diazepam and its major metabolites in human plasma. Talanta. 2008 May;75(3):671-6.
11. Samanidou VF, Pechlivanidou AP, Papadoyannis IN. Development of a validated HPLC method for the determination of four 1,4-benzodiazepines in human biological fluids. J Sep Sci. 2007 Mar;30(5):679-87.
12. Nudelmam NS, Waisbaum G. Isolation and structure elucidation of novel products of the acidic degradation of diazepam. J Pharm Sci. 1995 Feb;84(2):208-11.
13. Chiba K, Horn H, Chiba T, Kato Y, Hirano T, Ishizaki T. A development and preliminary application of high-performance liquid chromatographic assay of urinary metabolites of diazepam in humans. J Chromatogr. 1995;668:77-84.
14. Hewala II. GLC and HPLC determination of diazepam and its degradation products in pharmaceutical formulations. Analytical Letters. 1992;25(10):1877-1905.
15. Smitha FM, Nuessle NO. HPLC method for determination of diazepam injection. Analytical Letters. 1982;15(4):363-71.
16. Brasil. Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos; fica revogada a Resolução RE n. 475, de 19 de março de 2002. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília (DF) 2003 jun. 02; Sec.1, (104):56-9.

**How to cite this article:** Mendes AM, Fonseca EB, Santos N, Arruda MA. Validation of a stability indicating uplc method for assay and impurity determination of diazepam in tablets. Arq Bras Med Naval. 2015 Jan/Dez;76(1):49-53.