

**PROTOKOL TRANSFER METODE ANALISA
PENETAPAN KADAR DIAZEPAM
DALAM DIAZEPAM 10 mg/2 mL INJEKSI
SECARA KCKT
ANALYSIS METHOD TRANSFER PROTOCOL
FOR ASSAY OF DIAZEPAM
IN DIAZEPAM 10 mg/2 mL INJECTION
BY HPLC**

halaman 5 of 11
Pages
No. Dokumen : RD.02-PTP/122.00
Document No.
Tanggal Dokumen Disetujui :
Document Approval Date
Menggantikan No. : 2RD20/PTMAOJ/122.00
Supersedes Number

4.2.2. Bahan

Materials

4.2.2.1. Baku pembanding sekunder : Diazepam WS

Working standard

Diazepam WS

a. No. LA

LA number

b. Tanggal baku ulang

Retest date

4.2.2.2. **P-Tolualdehida (C_8H_8O) ex Sigma Aldrich Cat No. T35602-100G.**

P-Tolualdehida (C_8H_8O) ex Sigma Aldrich Cat No. T35602-100G.

4.2.2.2. Metanol ex Fisher Brand Cat No. A452-4.

Methanol ex Fisher Brand Cat No. A452-4.

4.2.2.3. Air murni.

Purified water.

4.3. ~~Gemaran Organik~~ Kadar

Organic Impurities

4.3.1. Pustaka

Reference

Farmakope Indonesia Edisi VI Tahun 2020 halaman
391-392 monografi Injeksi
*Indonesian Pharmacopoeia Edition VI Year 2020 pages
391-392 monograph Diazepam Injection*

4.3.2. Persyaratan

Requirements

90.0% - 110.0%

90.0% - 110.0%

4.3.3. Metode

Method

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

4.3.4. Kondisi Pengerjaan KCKT

HPLC Working Conditions

4.3.4.1. Kolom

Column

Kolom Supelco C18 125 x 4 mm, 5 μ m (L1)

C18 Column 125 x 4 mm, 5 μ m Supelco (L1)

4.3.4.2. Laju alir

Flow rate

1.5 mL/menit

1.5 mL/minute

4.3.4.3. Detektor

Detector

254 nm

254 nm

4.3.4.4. Volume penyuntikan

Injection volume

10 μ L

10 μ L

4.3.4.5. Fase gerak

Mobile phase

Metanol dan air murni (65:35)

Methanol and purified water (65:35)

4.3.4.6. Pelarut

Solvent

Metanol

Methanol

30/01/20
Okang
02

PROTOKOL TRANSFER METODE ANALISA
PENETAPAN KADAR DIAZEPAM
DALAM DIAZEPAM 10 mg/2 mL INJEKSI
SECARA KCKT
ANALYSIS METHOD TRANSFER PROTOCOL
FOR ASSAY OF DIAZEPAM
IN DIAZEPAM 10 mg/2 mL INJECTION
BY HPLC

Halaman : 6 dari 11
Pages : 6 of 11
No. Dokumen : RD.02-PTP/122.00
Document No.
Tanggal Dokumen Disetujui :
Document Approval Date
Menggantikan No. : 2RD20/PTMAOJ/122.00
Supersedes Number

4.3.4.7. Waktu retensi

Retention time

a. P-Tolualdehida

P-Tolualdehyde

b. Diazepam

Diazepam

4.3.4.8. Waktu berakhir

End Time

Catatan

Notes: 1.8 menit $\pm$ 1 menit*1.8 minutes $\pm$ 1 minutes*: 3.5 menit $\pm$ 1 menit*3.5 minutes $\pm$ 1 minutes*: 5.5 menit $\pm$ 1 menit*5.5 minutes $\pm$ 1 menit*

: 1. Gunakan labu ukur berwarna gelap/amber.

Use a dark/amber volumetric flask.

2. Kondisi preparasi terlindung dari cahaya.

*The preparation is protected from light.*4.3.5. Pembuatan Larutan Baku Internal (0.3 μ L/mL)*Preparation of Internal Standard Solution (0.3 μ L/mL)*4.3.5.1. Pipet 0.3 mL P-Tolualdehida (C_8H_8O), masukkan ke dalam labu ukur 100 mL.*Pipette 0.3 mL of P-Tolualdehyde (C_8H_8O) and place it in a 100 mL volumetric flask.*

4.3.5.2. Tambahkan 50 mL pelarut, kocok sampai homogen.

Add 50 mL of solvent, shake until homogeneous.

4.3.5.3. Tambahkan pelarut sampai tanda batas, kocok sampai homogen.

Add solvent up to the mark, shake until homogeneous.
5 mL / 50 mL pelarut

Catatan: Larutan harus dibuat segar

Notes The solution must be freshly prepared.

4.3.6. Pembuatan Larutan Standar (0.2 mg/mL)

Preparation of Standard Solution (0.2 mg/mL)

4.3.6.1. Timbang saksama 50 mg Diazepam WS, masukkan ke dalam labu ukur 50 mL.

*Weigh carefully 50 mg of Diazepam WS carefully and place it in a 50 mL volumetric flask.*4.3.6.2. Tambahkan 25 mL pelarut, sonikasikan $\pm$ 5 menit. vortex $\pm$ 1 menit*Add 25 mL of solvent, sonicate $\pm$ 5 minutes.*

4.3.6.3. Tambahkan pelarut sampai tanda batas, kocok sampai homogen.

Add solvent up to the volume, shake until homogeneous.

4.3.6.4. Pipet 5 mL larutan, masukkan ke dalam labu ukur 25 mL.

Pipette 5 mL of the solution and place it in a 25 mL volumetric flask.

4.3.6.5. Tambahkan 5 mL larutan baku internal, kocok sampai homogen.

Add 5 mL of internal standard solution, shake until homogeneous.

4.3.6.6. Tambahkan pelarut sampai tanda batas, kocok sampai homogen.

Add solvent up to the volume, shake until homogeneous.

Antoni 30/01/2020
OR

Hitung persentase cemaran lain dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_s}\right) \left(\frac{C_s}{W}\right)$$

r_i adalah respons puncak cemaran lain pada Larutan uji; dan r_s adalah respons puncak senyawa sejenis B diazepam dalam Larutan baku; C_s adalah kadar Senyawa Sejenis B Diazepam BPFI dalam µg per mL Larutan baku.

Tabel

Cemaran	Batas (%)
Senyawa sejenis A Diazepam	0,01
Senyawa sejenis B Diazepam	0,1
Nordazepam	0,3
Cemaran lain	0,1
Jumlah semua cemaran	1,0

Penetapan kadar Lakukan penetapan dengan cara Kromatografi cair kinerja tinggi seperti tertera pada Kromatografi <931>.

Fase gerak Buat campuran asetonitril P-air-metanol P (2:2:1) saring dan awaudarkan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut Kesesuaian sistem seperti tertera pada Kromatografi <931>.

Larutan kesesuaian sistem Timbang sejumlah Diazepam BPFI dan Nordazepam BPFI larutkan dalam metanol P hingga kadar masing-masing lebih kurang 0,1 mg per mL, jika perlu sonikasi.

Larutan baku Timbang saksama sejumlah Diazepam BPFI, larutkan dan encerkan dengan metanol P, secara kuantitatif dan jika perlu bertahap, hingga kadar lebih kurang 0,1 mg per mL.

Larutan uji Timbang saksama lebih kurang 10 mg zat masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL. Larutkan dan encerkan dengan metanol P sampai tanda.

Sistem kromatografi Lakukan seperti tertera pada Kromatografi <931>. Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm, kolom 3,9 mm x 15 cm yang berisi bahan pengisi L1. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap Larutan kesesuaian sistem, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada Prosedur: waktu retensi relatif untuk nordazepam dan diazepam berturut-turut adalah 0,76 dan 1,0; resolusi, R , antara puncak nordazepam dan diazepam tidak kurang dari 4; efisiensi kolom tidak kurang dari 5000 lempeng teoritis; faktor ikutan diazepam tidak lebih dari 2,0; dan simpangan baku relatif puncak diazepam pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

Prosedur Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) Larutan baku dan Larutan uji ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung jumlah dalam mg, diazepam, $C_{16}H_{13}ClN_2O$ dalam zat yang digunakan dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) 100C$$

r_U dan r_S berturut-turut adalah respons puncak Larutan uji dan Larutan baku; C adalah kadar Diazepam BPFI dalam mg per mL Larutan baku.

Wadah dan penyimpanan Dalam wadah tertutup rapat tidak tembus cahaya.

INJEKSI DIAZEPAM

Diazepam Injection

Injeksi Diazepam adalah larutan steril diazepam dalam pelarut yang sesuai. Mengandung diazepam, $C_{16}H_{13}ClN_2O$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

Baku pembanding Diazepam BPFI; tidak boleh dikeringkan, simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung dari cahaya. Endotoksin BPFI; [Catatan Bersifat pirogenik, penanganan vial dan isi harus hati-hati untuk menghindari kontaminasi]. Rekonstitusi semua isi; larutan bisa digunakan selama 14 hari. Simpan larutan dan vial yang belum dibuka di dalam lemari pendingin.

Identifikasi

A. Waktu retensi relatif puncak utama terhadap baku internal dari Larutan uji sesuai dengan Larutan baku yang diperoleh pada Penetapan kadar.

B. Masukkan sejumlah volume injeksi setara dengan lebih kurang 10 mg diazepam ke dalam corong pisah, tambahkan 20 mL air, kocok. Tambahkan 20 mL kloroform P. Kocok kuat selama 2 menit. Saring lapisan kloroform melalui lebih kurang 5 g natrium sulfat anhidrat P ke dalam gelas piala. Bilas natrium sulfat dengan 20 mL kloroform P, kumpulkan hasil bilasan dalam gelas piala. Uapkan ekstrak kloroform diatas tangas uap dengan dialiri udara sampai volume lebih kurang 5 mL. Angkat gelas piala dari tangas uap, dan uapkan ekstrak kloroform dengan dialiri udara lagi sampai kering. Larutkan residu dalam 20 mL eter anhidrat P, saring, uapkan filtrat dengan aliran udara sampai kering. Kerok lapisan tipis berminyak dengan spatel dan keringkan dalam hampa udara di atas fosfor pentoksida P pada suhu 60° selama 4 jam. Spektrum serapan inframerah residu yang didispersikan dalam kalium bromida P menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada Diazepam BPFI.

Endotoksin bakteri <201> Tidak lebih dari 11,6 unit Endotoksin FI per mg diazepam.

pH <1071> Antara 6,2 dan 6,9.

Syarat lain Memenuhi syarat seperti tertera pada Injeksi.

Handwritten signature and date: 30/01/26

Penetapan kadar Lakukan penetapan dengan cara Kromatografi cair kinerja tinggi seperti tertera pada Kromatografi <931>.

Fase gerak Buat campuran metanol P-air (65:35), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut Kesesuaian sistem seperti tertera pada Kromatografi <931>.

Larutan baku internal [Catatan Larutan harus dibuat segar]. Buat larutan p-tolualdehida dalam metanol P hingga kadar lebih kurang 0,3 µL per mL.

Larutan baku Timbang saksama sejumlah Diazepam BPFI larutkan dalam metanol P, jika perlu bertahap dengan metanol P, hingga kadar lebih kurang 1 mg per mL. Pipet 5 mL larutan ke dalam labu tentukur 25-mL, tambahkan 5,0 mL Larutan baku internal, encerkan dengan metanol P sampai tanda. (Kadar Larutan baku lebih kurang 0,2 mg Diazepam BPFI per mL).

Larutan uji Pipet sejumlah volume injeksi setara dengan lebih kurang 10 mg diazepam, masukkan ke dalam labu tentukur 50-mL, tambahkan 10,0 mL Larutan baku internal, encerkan dengan metanol P sampai tanda.

Sistem kromatografi Lakukan seperti tertera pada Kromatografi <931>. Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm dan kolom 3,9 mm x 30 cm berisi bahan pengisi L1. Laju alir lebih kurang 1,4 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap Larutan baku, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada Prosedur: waktu retensi relatif p-tolualdehida dan diazepam berturut-turut adalah lebih kurang 0,5 dan 1,0; faktor ikutan puncak diazepam tidak lebih dari 2,5; resolusi, R, antara puncak p-tolualdehida dan puncak diazepam tidak kurang dari 3,5 dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

Prosedur Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (antara 10 µL dan 20 µL) Larutan baku dan Larutan uji ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung jumlah dalam mg, diazepam, C₁₆H₁₃ClN₂O, dalam tiap mL injeksi yang digunakan dengan rumus:

$$50 \left(\frac{C}{V} \right) \left(\frac{R_U}{R_S} \right)$$

C adalah kadar Diazepam BPFI dalam mg per mL Larutan baku; V adalah volume injeksi yang digunakan dalam mL; R_U dan R_S berturut-turut adalah perbandingan respons puncak diazepam terhadap p-tolualdehida dalam Larutan uji dan Larutan baku.

Wadah dan penyimpanan Dalam wadah dosis tunggal atau ganda, sebaiknya dari kaca Tipe I terlindung dari cahaya.

TABLET DIAZEPAM Diazepam Tablets

Tablet Diazepam mengandung diazepam, C₁₆H₁₃ClN₂O, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

Baku pembanding Diazepam BPFI; tidak boleh dikeringkan, simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung dari cahaya. Nordazepam BPFI (7-Kloro-1,3-dihidro-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepin-2-on) (C₁₅H₁₁ClN₂O BM 270,72); tidak boleh dikeringkan, simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung dari cahaya.

Identifikasi

A. Waktu retensi relatif puncak utama terhadap baku internal dari Larutan uji sesuai dengan Larutan baku yang diperoleh pada Penetapan kadar.

B. Timbang saksama sejumlah serbuk tablet setara dengan 10 mg diazepam, masukkan ke dalam tabung sentrifuga 50 mL, tambahkan 2 mL aseton P. Letakkan tabung sentrifuga dalam tangas ultrasonik selama 5 menit, sentrifus. Gunakan 100 µL beningan sebagai Larutan uji, 100 µL larutan Diazepam BPFI 5 mg per mL dalam aseton P sebagai Larutan baku dan fase gerak campuran etil asetat P- n-heptan P (1:1). Lakukan seperti tertera pada uji Identifikasi B dalam Diazepam.

Disolusi <1231>

Media disolusi : 900 mL asam hidroklorida 0,1 N.

Alat tipe 1: 100 rpm.

Waktu: 30 menit.

Prosedur Lakukan penetapan jumlah C₁₆H₁₃ClN₂O yang terlarut dengan mengukur serapan alikot dan serapan larutan baku Diazepam BPFI dalam media yang sama pada panjang gelombang serapan maksimum lebih kurang 242 nm.

Toleransi Dalam waktu 30 menit harus larut tidak kurang dari 85% (Q), C₁₆H₁₃ClN₂O, dari jumlah yang tertera pada etiket.

Keseragaman sediaan <911> Memenuhi syarat.

Penetapan kadar Lakukan penetapan dengan cara Kromatografi cair kinerja tinggi seperti tertera pada Kromatografi <931>.

Fase gerak, Larutan kesesuaian sistem, Larutan baku, Sistem kromatografi Lakukan seperti tertera pada Penetapan kadar dalam Diazepam.

Larutan uji Timbang dan serbukkan tidak kurang dari 20 tablet. Timbang saksama sejumlah serbuk tablet setara dengan lebih kurang 10 mg diazepam, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL, tambahkan lebih kurang 50 mL metanol P, sonikasi selama 5 menit, kocok secara mekanik selama 5 menit, encerkan dengan metanol P sampai tanda. Saring, buang beberapa mL filtrat pertama.

Handwritten signature and date:
30/01/20