

10-1-1986

The comparative study of methods used in the quantitative analysis of diazepam in plasma

A. Auansakul

T. Punpanich

Follow this and additional works at: <https://digital.car.chula.ac.th/clmjjournal>



Part of the [Medicine and Health Sciences Commons](#)

Recommended Citation

Auansakul, A. and Punpanich, T. (1986) "The comparative study of methods used in the quantitative analysis of diazepam in plasma," *Chulalongkorn Medical Journal*: Vol. 30: Iss. 10, Article 6.
Available at: <https://digital.car.chula.ac.th/clmjjournal/vol30/iss10/6>

This Article is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in Chulalongkorn Medical Journal by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ปริมาณยา ไดอาซีแพมในพลาสมา

อรุณี อวนสกุล*

ทวีพร พันธุ์พานิชย์**

Auansakul A, Punpanich T. The comparative study of methods used in the quantitative analysis of diazepam in plasma. Chula Med J 1986 Oct; 30 (10) : 997-1005

The study was performed by three different methods, namely, spectrophotometric, gas chromatographic and high pressure liquid chromatographic methods. The spectrophotometric method, measured at ultraviolet wavelength, demonstrated a higher range of linearity, but a lower precision and recovery than the other two methods. However, there were good correlations with statistical significance ($p < 0.01$) between each method. It is, therefore, concluded that all three methods give reliable results for diazepam analysis.

* ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

** ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Diazepam เป็น minor tranquilizer ชนิดหนึ่ง ซึ่งใช้กันแพร่หลายในการรักษาโรคต่าง ๆ อาทิ เช่น anxiety, insomnia, psychophysiological disorders, muscle spasm, alcohol withdrawal, seizures และ minor pain⁽¹⁾ เมื่อมีการใช้มากโอกาสที่จะถูกนำไปใช้อย่างผิดพลาด เช่น รับประทานยาเกินขนาด ก็มากขึ้น โดยเฉพาะในประเทศไทยซึ่งมีการซื้อขายยาอย่างเสรี ถึงแม้ว่าปัจจุบันจะมีมาตรการควบคุมการซื้อยานี้ก็ตาม แต่ก็ยังมีผลเพียงทำให้ความสะดวกในการซื้อหารับประทานเองลดลงเท่านั้น จึงยังมีคนจำนวนมากไม่น้อยที่ได้รับอันตรายจากการใช้ยานี้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากความรู้เท่าไม่ถึงการณ์หรืออาจเป็นการเจตนา ดังนั้นการวิเคราะห์หาปริมาณยา diazepam ในเลือดจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการรักษาผู้ป่วยเหล่านี้ เพราะจะช่วยให้แพทย์ผู้รักษาสามารถวินิจฉัยหาสาเหตุได้ถูกต้องและทำการรักษาได้ทันที่ อีกประการหนึ่ง การวิเคราะห์หาปริมาณยา diazepam ในเลือดยังมีความจำเป็นในกรณีที่ใช้ยานี้รักษาคนไข้ที่เป็นโรคชัก เพราะ plasma level ของยานี้มีความสัมพันธ์เป็นอย่างดีกับ seizure control⁽²⁾ ดังนั้นการควบคุมระดับยาในเลือดให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมอยู่เสมอจะช่วยให้การรักษามีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

การวิเคราะห์หาปริมาณยา diazepam ปัจจุบันทำได้หลายวิธี เช่น spectrophotometric method⁽³⁾, gas chromatographic method⁽⁴⁻¹⁰⁾ และ high pressure liquid chromatographic method⁽⁸⁻¹³⁾ เป็นต้น ซึ่งสองวิธีหลังนี้ก็ยังมีผู้รายงานว่าให้ผลใกล้เคียงกันดี⁽⁸⁻¹⁰⁾ แต่ยังไม่มียุติศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างทั้งสามวิธี ซึ่งข้อมูลนี้มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ในประเทศไทยซึ่งมักจะมีแต่เครื่อง spectrophotometer เท่านั้น งานวิจัยนี้จึงได้ทำขึ้นโดยมีวัตถุประสงค์ดังนี้คือ 1) เพื่อประเมินคุณสมบัติทางการปฏิบัติ (performance characteristics) ของวิธีวิเคราะห์ทั้งสาม

วิธี 2) เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างวิธีวิเคราะห์ทั้งสามวิธี ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพิจารณาหาเอาวิธี spectrophotometry มาใช้ในการหาปริมาณยา diazepam ในห้องปฏิบัติการทั่ว ๆ ไป

วัสดุและวิธีการ

พลาสมาที่ใช้ในการทดลองได้มาจากธนาคารเลือด โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ซึ่งได้มาจากการนำเลือดคนไข้ไปตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1-2 วัน เพื่อให้เม็ดเลือดแดงตกตะกอนแล้วแยกเอาเม็ดเลือดแดงนี้ไปให้แก่คนไข้ที่เป็นโรคโลหิตจาง ส่วนที่เหลือเป็นพลาสมาซึ่งผู้วิจัยได้ขอมาใช้สำหรับทำการทดลองอยู่เป็นประจำ พลาสมาจะถูกนำมาเติมยา diazepam ให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการสำหรับการทดลองแต่ละครั้ง สารเคมีที่ใช้ทั้งหมดเป็น analytical grade ยกเว้นน้ำยาที่ใช้กับเครื่อง high pressure liquid chromatograph (HPLC) ซึ่งเป็น HPLC grade

1. รูปแบบของการศึกษา

การศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติด้านการปฏิบัติ (performance characteristics) ของวิธีวิเคราะห์แต่ละวิธี

1.1 Linearity ศึกษาดูว่าแต่ละวิธีมีความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (standard curve) สูงถึงความเข้มข้นเท่าใด โดยทำ standard ขึ้นมา 2 ชุดสำหรับการทดลองแต่ละครั้ง แต่ละชุดมีความเข้มข้น 0, 5, 10, 20, 30, 40 และ 50 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ

1.2 Precision ศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์แต่ละวิธี โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 8, 10 และ 30 $\mu\text{g/ml}$ อย่างน้อยตัวอย่างละ 5 ครั้งทุกความเข้มข้น แล้วนำผลที่ได้ไปคำนวณหาค่า standard deviation (SD) และ mean (\bar{X}) และจากผลที่ได้คำนวณหาค่า % coefficient of variation (%CV)

โดยใช้สูตร

$$\%CV = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

1.3 Recovery ศึกษาความแม่นยำ (accuracy) ของวิธีการวิเคราะห์ โดยเติมยา diazepam จำนวนที่ทราบแน่นอนลงในตัวอย่างและนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้ถูกเติมยา ผลต่างของการวิเคราะห์ก็คือ recovery ซึ่งควรจะเท่ากับหรือใกล้เคียงกับปริมาณยาที่เติมลงไป

1.4 Correlation study ศึกษาโดยเตรียมตัวอย่างขึ้นมา 7 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างแบ่งเป็น 3 หลอดและนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโดยทั้ง 3 วิธี ผลที่ได้นำมาหาความสัมพันธ์ระหว่างแต่ละวิธีโดยเขียนจุดลงบนแผนกราฟและคำนวณหาค่าสมการความถดถอยเชิงเส้นตรง (linear regression analysis) และคำนวณหาค่า correlation coefficient (r)

2. วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณยา diazepam

2.1 Spectrophotometric method

ใช้วิธีของ Walberg⁽³⁾ โดยนำตัวอย่างพลาสมา 2 มล. ใส่ในหลอดแก้วที่มีจุกปิดสนิท เติม phosphate solution (3M) ลงไป 0.1 มล. เขย่าเล็กน้อย เติม chloroform 4 มล. เขย่าเบา ๆ นาน 3 นาที และปั่นด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาทีใช้เวลา 3 นาที ดูดชั้นบนทิ้ง นำชั้นล่าง (ชั้น chloroform) มากรอง และดูดมา 3 มล. ใส่หลอดใหม่ นำไปประเหยแห้งบน water bath ละลายกากที่เหลือด้วย n-hexane 5 มล. เขย่าแรง ๆ เพื่อให้แน่ใจว่า diazepam ละลายออกมาหมด เติมกรด HCl (2N) 4 มล. ปิดจุกและเขย่านาน 2 นาที ดูดชั้นบนทิ้งและนำชั้นล่าง (ชั้นของกรด) ไปวัด absorbance ที่ 240 และ 265 nm โดยใช้ ultraviolet spectrophotometer คำนวณหาปริมาณยา diazepam ในตัวอย่าง (C_s) โดยใช้สูตรดังนี้

$$C_s = \frac{(A_{240} - A_{265})_{\text{sample}}}{(A_{240} - A_{265})_{\text{standard}}} \times \text{Conc. standard}$$

2.2 Gas chromatographic (GC)

method เป็นวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นมาเองโดยเอาพลาสมา 1 มล. ใส่ในหลอดแก้วที่มีจุกปิดสนิท เติม internal standard (caffeine solution 100 มก./100 มล.) 0.5 มล. เติม ether 7 มล. ปิดจุกเขย่าเบา ๆ 3 นาที ปั่นด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาทีใช้เวลา 3 นาที ดูดเอาชั้นบน (ชั้น ether) มากรองผ่านสำลี ซึ่งบรรจุอยู่ใน pasteur pipet และนำ filtrate ที่ได้ไปประเหยแห้งบน water bath ละลายกากที่เหลือด้วย acetone 50 μ l เขย่าให้ diazepam ละลายและฉีด 0.5 μ l เข้าเครื่อง gas chromatograph (Pye Unicam Series 304) ซึ่งมีสภาพสำหรับปฏิบัติงานดังนี้

column - 3% OV-17 on Gas Chrom Q, 100/120 mesh

detector - Flame Ionization Detector (FID)

temperature - column 180° Celsius

- detector 300° Celsius

- injector 275° Celsius

carrier gas - N₂ 20-30 ml/min

จาก chromatogram ที่ได้นำมาวัดส่วนสูงของแต่ละ peak และนำไปคำนวณหาปริมาณยาในตัวอย่างจากสูตร

$$C_s = C_{\text{std}} \times \frac{PR_s}{PR_{\text{std}}}$$

C_s = ปริมาณยา diazepam ในตัวอย่าง

C_{std} = ปริมาณยา diazepam ใน standard

PR_s = peak ratio (อัตราส่วนความสูงของ diazepam peak หารด้วยความสูงของ caffeine peak) ของตัวอย่าง

PR_{std} = peak ratio ของ standard

2.3 High pressure liquid chromatographic (HPLC) method

ใช้วิธีของ Peat และ Kopjak⁽¹⁰⁾ โดยตัดแปลงเล็กน้อยที่ขั้นตอนการสกัดสาร วิธีโดยสังเขปมีดังนี้ นำพลาสมา 1 มล. ใส่ในหลอดแก้วที่มีจุกปิดสนิท เติม internal

standard (nitrazepam 2 mg/100 ml MeOH) 0.2 มล. และ chloroform 6 มล. ปิดจุกเขย่าเบา ๆ 3 นาที ปั่นที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที ใช้เวลานาน 3 นาที ดูดชั้นบนทิ้ง นำชั้นล่าง (ชั้น chloroform) ไปกรองและเอา filtrate ที่ได้ไประเหยแห้งบน water bath ละลายกากที่เหลือด้วย 50 μ l MeOH เขย่าให้แน่ใจว่ายาละลายออกมาหมดแล้วฉีด 15 μ l เข้าเครื่อง high pressure liquid chromatograph (HPLC, Pye Unicam) ซึ่งมีสภาพสำหรับการปฏิบัติงานดังนี้

column – Lichrosorb RP8, 5 micron
 detector – Pye Unicam PU 4020
 UV detector, WV 254 nm
 mobile phase – Phosphate buffer (0.025 M, pH 7.5)/MeOH : 58/42

flow rate – 1 ml/min

จาก chromatogram ที่ได้วัดความสูงของ peak diazepam และ peak nitrazepam คำนวณหาค่า peak ratio ของ diazepam หารด้วย nitrazepam และนำไปคำนวณหาปริมาณยาในตัวอย่างจากสูตรเช่นเดียวกับวิธี GC (ข้อ 2.2)

ผล

จากการทดลองพบว่าวิธี spectrophotometry มีกราฟมาตรฐานซึ่งมีความเป็นเส้นตรง (linearity) ในช่วงความเข้มข้น 0-50 μ g/ml (รูปที่ 1) ส่วนความเที่ยงตรง (precision) ของวิธีนี้ที่ความเข้มข้น 8, 10 และ 30 μ g/ml ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 ซึ่งมีค่า %CV เท่ากับ 4.43, 6.14 และ 4.14% ตามลำดับ %recovery ของวิธี spectrophotometry ในช่วงความเข้มข้น 4.95-29.7 μ g/ml พบว่ามีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 80% (range 75.5-84.7%)

บ่งชี้ว่ามีความคลาดเคลื่อนชนิด proportional systematic error 20%

วิธี GC มีกราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0-40 μ g/ml (รูปที่ 2) ซึ่งอยู่ในระดับเหมาะสมพอที่จะนำไปใช้งานได้ เพราะระดับยาในเลือดที่ก่อให้เกิดอันตรายส่วนใหญ่มักจะอยู่ในช่วงความเข้มข้น 10-30 μ g/ml ความเที่ยงตรงของวิธี GC ที่ความเข้มข้น 8, 10 และ 30 μ g/ml มีค่าเท่ากับ 2.40, 2.14 และ 4.58% CV ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ส่วนค่า %recovery ในช่วงความเข้มข้น 4.55-27.27 μ g/ml เฉลี่ยเท่ากับ 97.3% (range 82.03-106.25%) ซึ่งมีความคลาดเคลื่อนชนิด proportional systematic error 2.7%

วิธี HPLC มีกราฟมาตรฐานซึ่งมีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0-40 μ g/ml (รูปที่ 3) ความเที่ยงตรงที่ความเข้มข้น 8, 10 และ 30 μ g/ml มีค่าเท่ากับ 4.26, 2.05 และ 4.02% %CV ตามลำดับ (ตารางที่ 3) %recovery ของวิธี HPLC ที่ช่วงความเข้มข้น 4.55-27.27 μ g/ml มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 102.9% (range 92.98-110.55%) แสดงความคลาดเคลื่อนชนิด proportional systematic error 2.9%

ตารางที่ 4 แสดงผลการวิเคราะห์ตัวอย่าง 7 ตัวอย่างโดยทั้ง 3 วิธีคือ วิธี spectrophotometry, GC และ HPLC ซึ่งผลการทดลองนี้เมื่อนำไปทำ linear regression analysis คำนวณหาค่าสมการความถดถอยเชิงเส้นตรง (linear regression equation) และค่าความสัมพันธ์ (correlation coefficient) ระหว่างแต่ละวิธี ได้ค่าดังแสดงไว้ในตารางที่ 5 ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นว่าแต่ละวิธีมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$)

Table 1 : Precision of spectrophotometric method for diazepam analysis.

diazepam ($\mu\text{g/ml}$)	$(A_{240} - A_{265}) \times 10^{-2}$								\bar{X}	SD	%CV
	1	2	3	4	5	6	7	8			
8	6.5	6.2	6.0	5.8	5.9	6.5	5.9	6.2	6.1	0.27	4.43
10	10.8	10.5	10.2	9.8	9.1	-	-	-	10.1	0.62	6.14
30	27.2	29.5	26.4	28.2	27.9	-	-	-	27.8	1.15	4.14

Table 2 : Precision of gas chromatographic method for diazepam analysis.

diazepam ($\mu\text{g/ml}$)	peak ratio					\bar{X}	SD	%CV
	1	2	3	4	5			
8	2.30	2.35	2.22	2.24	2.32	2.29	0.055	2.40
10	2.97	2.88	2.98	2.86	2.83	2.90	0.062	2.14
30	10.00	10.50	10.00	11.00	10.90	10.48	0.480	4.58

Table 3 : Precision of high pressure liquid chromatographic method for diazepam analysis.

diazepam ($\mu\text{g/ml}$)	peak ratio					\bar{X}	SD	%CV
	1	2	3	4	5			
8	3.97	4.33	3.94	4.21	3.98	4.086	0.174	4.26
10	5.32	5.35	5.32	5.28	5.35	5.324	0.109	2.05
30	15.37	15.33	15.45	15.40	15.34	15.378	0.618	4.02

Table 4 : Results of diazepam analysis by spectrophotometric, gas chromatographic and high pressure liquid chromatographic methods.

actual conc. ($\mu\text{g/ml}$)	measured conc. ($\mu\text{g/ml}$) by		
	spectrophotometric method	GC method	HPLC method
8.0	6.2	8.17	7.37
10.0	10.1	10.59	9.37
13.64	12.8	12.90	12.74
18.18	17.8	18.83	18.60
27.27	25.4	28.20	25.83
30.00	27.8	33.28	29.94
36.36	34.8	37.10	37.08

Table 5 : Linear regression equations and correlation coefficients between spectrophotometric, gas chromatographic and high pressure liquid chromatographic methods.

method	linear regression equation	correlation* coefficient
spectrophotometric vs GC	$y = 0.99 + 0.928x$	0.997
spectrophotometric vs HPLC	$y = 1.73 + 0.892x$	0.992
GC vs HPLC	$y = -0.75 + 1.040x$	0.994

* All correlation coefficients were statistically significant values ($p < 0.01$).

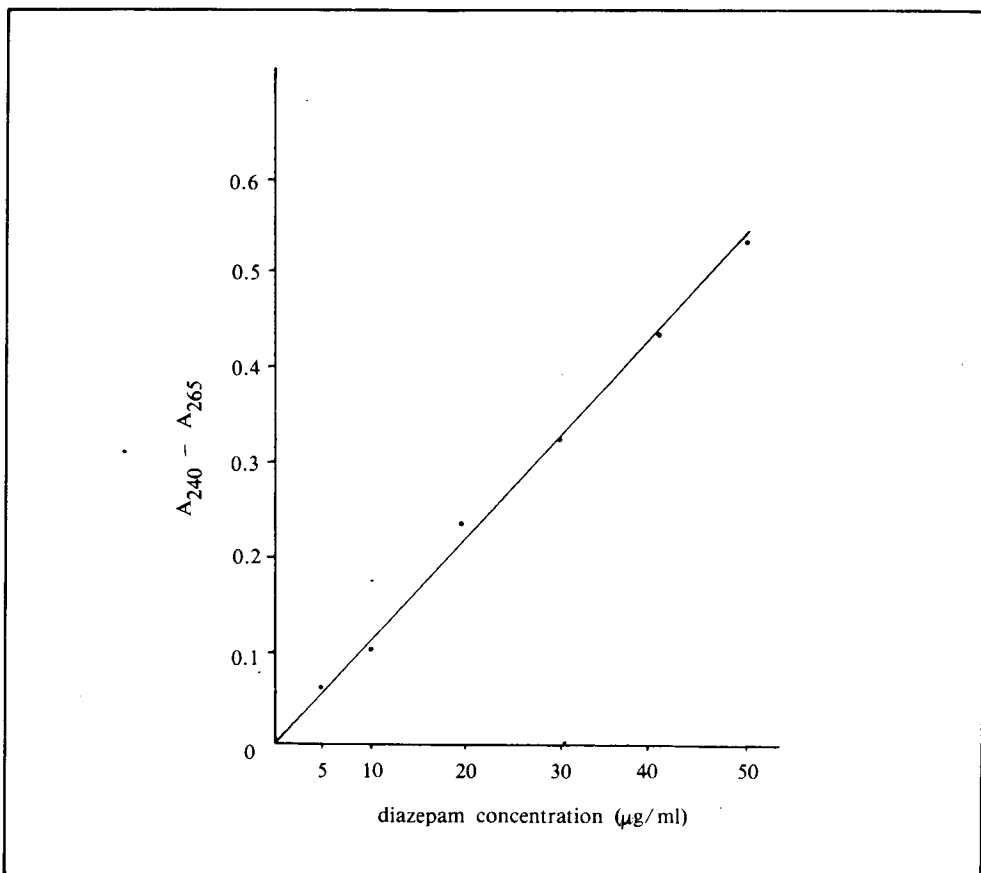


Figure 1. Standard curve of diazepam analysis by spectrophotometric method.

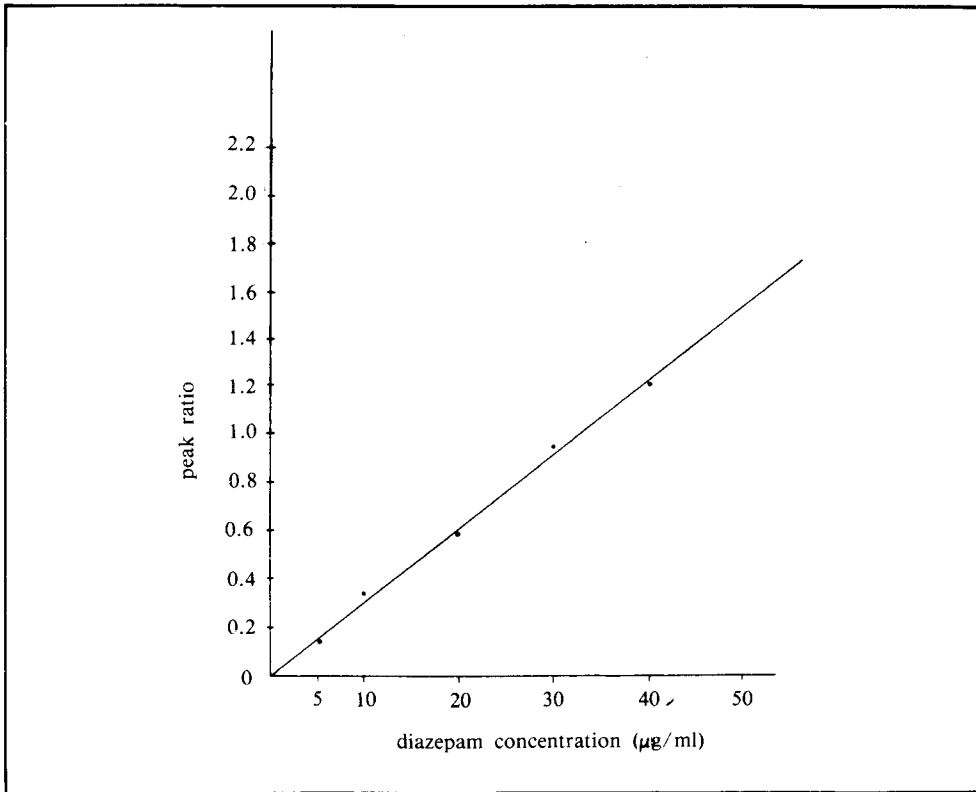


Figure 2. Standard curve of diazepam analysis by gas chromatographic method.

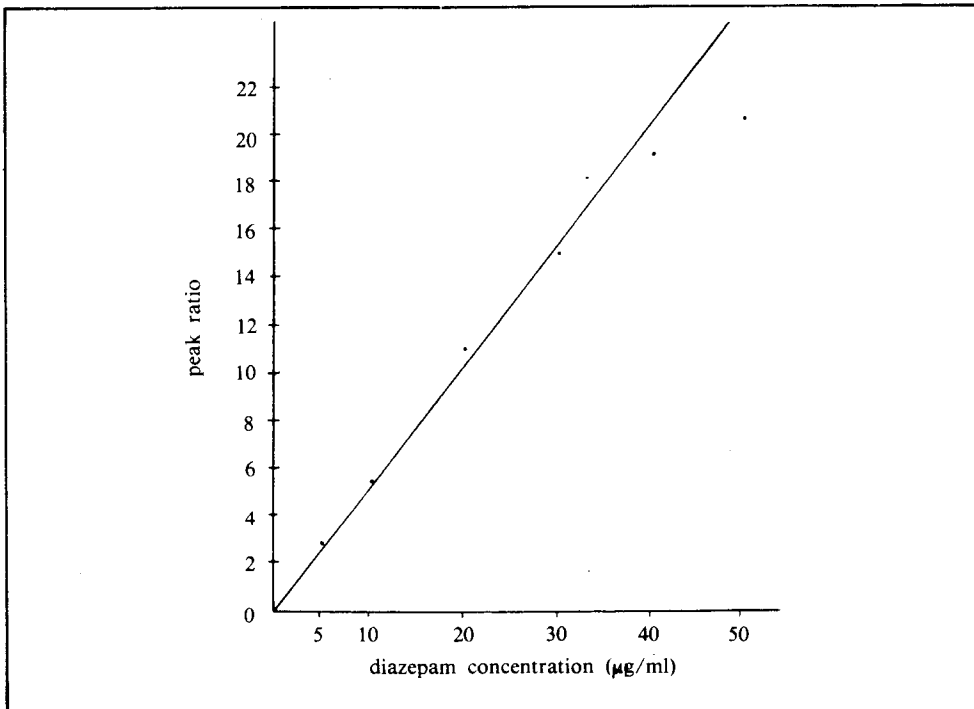


Figure 3. Standard curve of diazepam analysis by high pressure liquid chromatographic method.

รณและสรุปผล

จากการทดลองนี้พบว่าทั้งวิธี spectrophotometry, GC และ HPLC ต่างก็ให้ผลที่เชื่อถือได้สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณยา diazepam ในพลาสมา วิธี spectrophotometry มี precision และ recovery ต่ำกว่าอีก 2 วิธีเล็กน้อย ทั้งนี้เนื่องจากวิธี spectrophotometry ต้องผ่านขั้นตอนในการสกัดหลายครั้ง อย่างไรก็ตามข้อแตกต่างอันนี้ก็เพียงข้อเสียเล็กน้อยของวิธี spectrophotometry เมื่อเทียบกับว่าเครื่อง ultraviolet spectrophotometer เป็นเครื่องที่มีราคาถูกกว่าเครื่อง GC หรือ HPLC ใช้ง่ายกว่าและมีแพร่หลายในห้องปฏิบัติการทั่วไป

การศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างวิธีพบว่ทั้ง 3 วิธีให้ผลการวิเคราะห์ที่ใกล้เคียงกันและมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) นอกจากนี้ค่าความสัมพันธ์ที่ได้จากการทดลองนี้ก็สอดคล้องกับค่าที่ได้จากการทดลองของผู้อื่น เช่น การทดลองของ Raisys et. al.⁽⁹⁾ ซึ่งได้ค่าความสัมพันธ์ระหว่างวิธี GC และ HPLC เท่ากับ 0.99 ในขณะที่การทดลองนี้ได้ค่าเท่ากับ 0.994

สรุปได้ว่าทั้ง 3 วิธีให้ผลที่เชื่อถือได้ในการวิเคราะห์หาปริมาณยา diazepam อย่างไรก็ตามแต่ละวิธีก็มีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันไป ซึ่งผู้ทดลองจะต้องนำไปพิจารณาเพื่อเลือกใช้วิธีที่เหมาะสมกับห้องปฏิบัติการของตนเอง ดังนี้ :-

วิธี spectrophotometry	วิธี GC	วิธี HPLC
เครื่องมือราคาถูกกว่า เครื่องมือใช้ง่าย ให้ผลเร็วกว่า ค่าใช้จ่ายต่อรายถูกกว่า ความจำเพาะเจาะจงต่ำ ความแม่นยำต่ำกว่า ความเที่ยงตรงต่ำกว่า	ราคาแพงกว่า ใช้อยากกว่า ให้ผลช้ากว่า ค่าใช้จ่ายต่อรายแพงกว่า ความจำเพาะเจาะจงสูงกว่า ความแม่นยำสูงกว่า ความเที่ยงตรงสูงกว่า	ราคาแพงกว่า ใช้อยากกว่า ให้ผลช้ากว่า ค่าใช้จ่ายต่อรายแพงกว่า ความจำเพาะเจาะจงสูงกว่า ความแม่นยำสูงกว่า ความเที่ยงตรงสูงกว่า

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นายแพทย์สุรินทร์ บุญยวีโรจน์ หัวหน้าแผนกธนาคารเลือด โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่ได้เอื้อเฟื้อพลาสมาสำหรับการใช้ในการทดลอง

อ้างอิง

- Baldessarini RJ. Drug and the treatment of psychiatric disorders. In : Gilman AG, Goodman SL, Gilman A, eds. The Pharmacological Basis of Therapeutics. 6 ed. New York : Macmillan Publishing, 1980.
- Booker HE, Celesia GG. Serum concentrations of diazepam in subjects with epilepsy. Arch Neurol 1973 Sep; 29 (3) : 191-194
- Walberg CB. Method for diazepam. In : Sunshine I, ed. Methodology

- for Analytical Toxicology. Ohio :
CRC PRESS, 1975. 119-120
4. Pape BE, Ribick MA, Analysis of me-
dazepam, diazepam, and metabolites
in plasma by gas-liquid chromato-
graphy with electrolytic conductivity
detection. J Chromatogr 1977 Jun
1; 136 (1) : 127-139
 5. De Gier JJ, 't Hart BJ. Sensitive gas
chromatographic method for the
determination of diazepam and
N-desmethyldiazepam in plasma.
J Chromatogr 1979 Jul 21; 163
(3) : 304-309
 6. Rutherford DM. Rapid micro-method
for the measurement of diazepam
and desmethyldiazepam in blood
plasma by gas-liquid chromatogra-
phy. J Chromatogr 1977 Jul 21;
137 (2) : 439-448
 7. Dhar AK, Kutt H. Monitoring dia-
zepam and desmethyldiazepam
concentrations in plasma by gas-
liquid chromatography, with use
of a nitrogen sensitive detector.
Clin Chem 1979 Jan; 25 (1) :
137-140
 8. Wallace JE, Schwertner HA, Shimek
EL. Analysis of diazepam and
nordiazepam by electron-capture
gas chromatography and by liquid
chromatography. Clin Chem 1979
Jul ; 25 (7) : 1296-1300
 9. Raisys VA, Friel PN, Graaff PR, Opheim
KE, Wilensky AJ. High-performance
liquid chromatographic and nordia-
zepam in plasma. J Chromatogr
1980 Oct 10; 183 (4) : 441-448
 10. Peat MA, Kopjak L. The screening
and quantitation of diazepam,
flurazepam and their metabolites
in blood and plasma by electron-
capture gas-chromatography and
high pressure liquid chromatography.
J Forensic Sci 1979 Jan; 24 (1) :
46-54
 11. Brodie RR, Chasseaud LF, Taylor T.
High-performance liquid chroma-
tographic determination of benzo-
diazepines in human plasma. J
Chromatogr 1978 Mar 21; 150 (2) :
361-366
 12. Bugge A. Quantitative high-performance
liquid chromatography of diazepam
and N-desmethyldiazepam in blood.
J Chromatogr 1976 Nov; 128 (1) :
111-116
 13. Mackichan JJ, Jusko WJ, Duffner
PK, Cohen ME. Liquid-chromato-
graphic assay of diazepam and
its major metabolites in plasma.
Clin Chem 1979 Jun; 25 (6) : 856-
859