

Analytical method validation and determination of dexamethasone in divided powder using reverse phase HPLC

Validasi metode analisis dan penetapan kadar deksametason dalam sediaan racikan secara KCKT fase terbalik

Florentinus Dika Octa Riswanto^{*}, Dita Maria Virginia, Dina Christin Ayuning Putri, Sri Hartati Yuliani

*Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma,
Kampus III Paingan Maguwoharjo, Depok, Sleman, Yogyakarta*

Submitted: 10-09-2017

Reviewed: 11-10-2017

Accepted: 20-10-2017

ABSTRAK

Deksametason sebagai glukokortikoid telah digunakan secara luas untuk mengurangi peradangan dan kerusakan jaringan pada berbagai kondisi. Senyawa ini biasa diresepkan dalam kombinasi dengan senyawa lain seperti klorfeniramin maleat untuk terapi penderita asma. Untuk menyediakan pelayanan kesehatan berorientasi pada pasien, penting dilakukan suatu pemantauan kualitas dan keamanan dari sediaan racikan yang biasa disebut pulveres atau puyer. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan suatu validasi metode analisis dan menetapkan keseragaman kadar deksametason dalam sediaan racikan yang diracik oleh apotek di Yogyakarta dan rumah sakit di Jawa Tengah, Indonesia. Suatu metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) tervalidasi dipilih untuk menetapkan kadar deksametason dalam sampel. Pada penelitian ini digunakan kolom ACE 5 C18 (250 x 4,6 mm) dan fase gerak berupa campuran metanol:air (65:35) dengan kecepatan alir sebesar 1 mL/menit. Deteksi dilakukan pada panjang gelombang UV 239 nm. Validasi metode analisis yang dilakukan meliputi uji kesesuaian sistem, batas deteksi, batas kuantifikasi, akurasi, presisi, dan linieritas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar deksametason pada sediaan racikan yang diracik oleh apotek di Yogyakarta dan rumah sakit di Jawa Tengah telah memenuhi kriteria penerimaan yang dipersyaratkan.

Kata kunci: pulveres, deksametason, keseragaman kadar, KCKT-UV

ABSTRACT

Dexamethasone as glucocorticoids has been widely used to reduce inflammation and tissue damage in a variety of conditions. It was commonly prescribed in combination with the other compounds such as chlorpheniramine maleate for the relief of asthma. It was important to observe the quality and safety of the combination dosage form, called pulveres or puyer in order to serve the patient oriented medication. This research aimed to develop analytical method validation and determine the content uniformity of the divided powder containing dexamethasone compounded by pharmacy in Yogyakarta and hospital in Central Java, Indonesia. A validated high performance liquid chromatography (HPLC) method was chosen to determine dexamethasone in the samples.

Penulis korespondensi:

Florentinus Dika Octa Riswanto

Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma

Kampus III Paingan Maguwoharjo, Depok, Sleman, Yogyakarta, 55282

Email: dikaocta@usd.ac.id

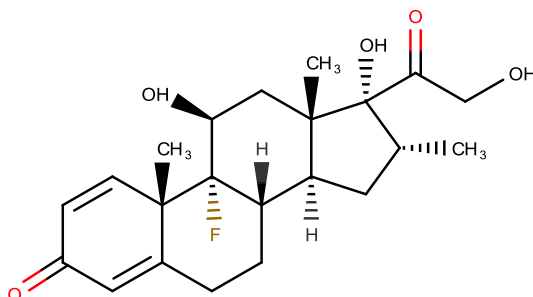
The column of ACE 5 C18 (250 x 4.6 mm) was used in this research and the methanol:water (65:35) was used as the mobile phase at the flow rate of 1 mL/min. The UV detection was performed at 239 nm. Analytical method validation was performed on the parameters of system suitability, limit of detection, limit of quantification, accuracy, precision, and linearity. The results showed that dexamethasone contains in divided powder compounded by pharmacy in Yogyakarta and hospital in Central Java were met the acceptance requirement.

Keywords: divided powder, dexamethasone, content uniformity, HPLC-UV.

PENDAHULUAN

Farmasis sebagai tenaga kesehatan bertanggung jawab untuk memastikan bahwa penggunaan obat yang aman dan efektif (Jackson and Lowey, 2010). Dalam bidang peracikan obat, farmasis selalu dihadapkan pada tantangan untuk menemukan cara-cara baru dan kreatif pemberian terapi pada pasien secara individu dan spesifik (Allen and Ansel, 2014). Deksametason (Gambar 1) yang merupakan obat steroid jenis glukokortikoid telah digunakan secara luas untuk mengurangi peradangan dan kerusakan jaringan dalam berbagai kondisi, termasuk penyakit radang usus, *rheumatoid arthritis*, dan tumor ganas. Glukokortikoid memiliki efek imunomodulator kuat dan memiliki sifat antiemetik (Waldron *et al.*, 2012). Deksametason tidak jarang diformulasikan bersama dengan klorfeniramin maleat (CTM) sebagai terapi asma (Darwish *et al.*, 2015). Dalam peresepannya sebagai bentuk sediaan, deksametason dapat diberikan kepada pasien dalam bentuk serbuk obat terbagi (*pulveres*) yang umumnya dibungkus dengan kertas perkamen (Dirjen POM RI, 2014).

Pada dosis yang tepat, deksametason juga digunakan dalam terapi asma akut pada pasien pediatrik yang ekivalen dengan prednison/prednisolon (Keeney *et al.*, 2014). Meskipun demikian, penggunaan deksametason pada dosis yang tidak tepat dapat berisiko mengubah respon imun bawaan, menyebabkan gangguan penyembuhan luka yang dikaitkan dengan kejadian perdarahan (Bellis *et al.*, 2014). Glukokortikoid secara umum diketahui menghambat fase inflamasi penyembuhan luka yang ditandai dengan migrasi sel dan peningkatan permeabilitas vaskular. Selain itu, obat ini juga mengurangi konsentrasi insulin yang memegang peran penting dalam proses reepitelisasi (Assante *et al.*, 2015). Oleh karena itu, perlu dilakukan uji kualitas sediaan berbahan aktif deksametason dalam bentuk racikan *pulveres* untuk menjamin keamanan dan keselamatan pasien.



Gambar 1. Struktur deksametason

Penetapan kadar senyawa deksametason dapat dilakukan dengan beberapa metode analisis seperti kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) (Darwish *et al.*, 2015; Razzaq *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2011), spektroskopi UV (Akhoundi-Khalafi and Shishehbore, 2015; Friedrich *et al.*, 2009) dan kromatografi lapis tipis kinerja tinggi (Rao *et al.*, 2012; Wisnuwardhani *et al.*, 2013). Pada penelitian ini dilakukan uji kualitas sediaan racikan *pulveres* yang diracik pada apotek di Yogyakarta dan rumah sakit di Jawa Tengah ditinjau dari keseragaman kadar zat aktif deksametason. Uji keseragaman kadar akan dilakukan dengan metode kromatografi cair kinerja tinggi fase terbalik yang tervalidasi. Metode KCKT dipilih karena sampel yang digunakan tidak hanya mengandung zat aktif deksametason namun juga klorfeniramin maleat. Melalui penelitian ini diharapkan diperoleh suatu metode analisis yang

sederhana, ekonomis, cepat, presisi dan akurat, serta efisien sehingga dapat diaplikasikan secara rutin dalam uji kualitas sediaan berbahan aktif deksametason.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Baku pembanding deksametason (*Nacalai*), metanol *for liquid chromatography* (*E. Merck*), aquabidestilata (Laboratorium Kimia Analisis Instrumen, Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma), dan sediaan racikan pulveres dengan zat aktif deksametason yang diperoleh dari apotek di Yogyakarta dan rumah sakit di Jawa Tengah. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik merk Ohaus[®] tipe PAJ1003 (max 120 g, min 0,001 g), spektrofotometer merk Shimadzu[®] tipe UVmini-1240, KCKT merk Shimadzu[®] LC-2010HT No. C21255111004 LP, Detektor UV/Vis, kolom ACE 5 C₁₈, 250x4,6 mm, seperangkat komputer merk HP[®], ultrasonikator merk Retsch[®] tipe T460, vakum merk Gast[®] model DOA-P504-BN, *membrane filter holder* merk Whatman[®] (kapasitas 300mL) Cat. No. 1960-004, *organic solvent membrane filter* merk Whatman[®] (ukuran pori 0,5 µm, diameter 47 mm); *inorganic solvent membrane filter* merk Whatman[®] (ukuran pori 0,45 µm, diameter 47 mm), penyaring *Milipore*, mikropipet Socorex[®] ukuran 20-200 µl, 100-1000 µl, dan 500-5000 µl, mortir dan stamper, dan seperangkat alat-alat gelas yang lazim digunakan di laboratorium analisis.

Jalannya Penelitian

Pengambilan sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sediaan racikan pulveres dengan zat aktif deksametason yang diracik oleh apotek di Yogyakarta dan rumah sakit di Jawa Tengah. Seluruh sampel pulveres yang diperoleh ditetapkan bobotnya tiap wadah kemudian dilakukan uji keseragaman kadar.

Sistem KCKT

Instrumen KCKT yang digunakan dalam penelitian ini adalah HPLC Shimadzu LC-2010 CHT dengan perangkat lunak LabSolution, kolom ACE 5 C₁₈, 250x4,6 mm. Detektor UV, panjang gelombang deteksi 239 nm. Fase gerak metanol:air (65:35) dengan sistem elusi secara isokratik. Volume injeksi 10 µL.

Pembuatan seri larutan baku

Sejumlah 10,0 mg baku deksametason dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL kemudian diencerkan dengan metanol hingga batas tanda sehingga didapatkan larutan induk deksametason dengan konsentrasi 1000 µg/mL. Dari larutan induk tersebut diambil sejumlah 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,10; dan 0,12 mL dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL kemudian diencerkan dengan metanol hingga batas tanda. Didapatkan seri larutan baku deksametason dengan konsentrasi 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0 dan 12,0 µg/mL. Masing-masing larutan yang dibuat disaring menggunakan *milipore* dan diawaudarakan menggunakan ultrasonikator selama 10 menit sehingga siap untuk diinjeksikan pada sistem KCKT.

Validasi Metode Analisis

Uji kesesuaian sistem

Uji kesesuaian sistem yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi penentuan faktor retensi, resolusi, *tailing factor*, dan jumlah lempeng teoretis.

Batas deteksi dan batas kuantifikasi

Batas deteksi dan batas kuantifikasi ditentukan berdasarkan pendekatan standar deviasi kurva kalibrasi konsentrasi rendah (Miller and Miller, 2010).

Linieritas

Linieritas ditentukan dengan penetapan seri konsentrasi baku deksametason (1-12 µg/mL). Diperoleh kurva kalibrasi hubungan antara kadar dengan AUC.

Akurasi dan presisi

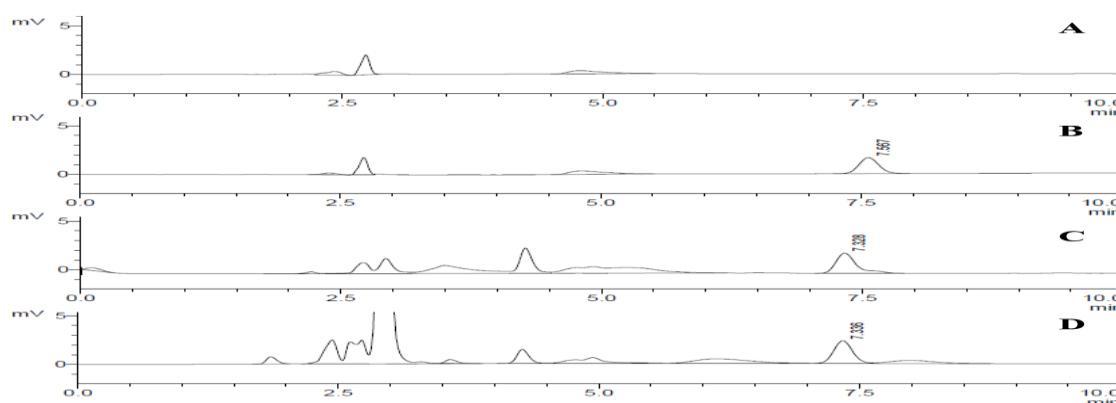
Ditimbang 50,0 mg sampel pulveres kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 25 mL, diencerkan dengan metanol hingga batas tanda. Diambil sejumlah masing-masing 2,5 mL sebanyak tiga kali kemudian dimasukkan ke dalam tiga labu takar 5,0 mL. Pada setiap labu takar ditambahkan larutan induk deksametason dengan volume 0,01; 0,02; dan 0,03 mL, ketiganya diencerkan dengan metanol hingga batas tanda. Masing-masing larutan yang dibuat disaring menggunakan *milipore* dan diawaudarakan menggunakan ultrasonikator selama 10 menit sehingga siap untuk diinjeksikan pada sistem KCKT. Ditetapkan akurasinya dengan perhitungan persen perolehan kembali serta ditetapkan presisinya dengan perhitungan persen standar deviasi relative baik secara *intraday* maupun *interday* (Gonzalez and Herrador, 2007).

Uji keseragaman kadar deksametason dalam sampel

Serbuk pulveres tiap wadah ditimbang kemudian dicatat bobotnya. Dilakukan homogenisasi dengan penggerusan masing-masing. Ditimbang 50,0 mg sampel pulveres kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 25 mL, diencerkan dengan metanol hingga batas tanda. Diambil sejumlah 2,5 mL kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 5,0 mL, diencerkan dengan metanol hingga batas tanda. Masing-masing larutan yang dibuat disaring menggunakan *milipore* dan diawaudarakan menggunakan ultrasonikator selama 10 menit sehingga siap untuk diinjeksikan pada sistem KCKT. Seluruh sampel sediaan racikan ditetapkan kadarnya kemudian dibandingkan keseragaman kadar untuk tiap wadahnya baik sampel dari apotek maupun rumah sakit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode KCKT fase terbalik yang telah dioptimasi. Melalui representasi profil kromatogram (Gambar 2) dapat diamati bahwa puncak deksametason pada baku, sampel dari apotek dan sampel dari rumah sakit muncul pada menit 7,56; 7,328; dan 7,336 berturut-turut. Adanya sedikit variasi waktu retensi antara baku dan sampel dapat terjadi karena adanya pengaruh dari matriks sampel tersebut (Shah *et al.*, 2000). Pada menit sekitar 4,262 terdapat puncak yang terdeteksi selain deksametason, puncak ini diduga adalah puncak senyawa CTM yang terdapat dalam matriks. CTM muncul pada waktu retensi yang lebih cepat dibandingkan dengan deksametason karena interaksinya lebih kuat terhadap fase gerak yang lebih polar pada sistem kromatografi fase terbalik.



Gambar 2. Representasi profil kromatogram blanko metanol (A), baku deksametason 1 µg/mL (B), sampel dari apotek (C), dan sampel dari rumah sakit (D). Kolom ACE 5 C₁₈, 250 x 4,6 mm Fase gerak metanol:air (65:35) dengan sistem elusi secara isokratik kecepatan alir 1 mL/menit. Volume injeksi 10 µL. Deteksi pada 239 nm

Uji kesesuaian sistem KCKT

Dalam pengembangan metode KCKT diperlukan suatu uji untuk memastikan kesesuaian untuk tujuan analisis. Uji kesesuaian sistem yang dilakukan tersebut dapat meliputi uji presisi, penentuan resolusi, bentuk puncak, dan faktor-faktor lain yang berkaitan dengan kesesuaian sistem (Snyder *et al.*, 2010). Hasil uji kesesuaian sistem dapat diamati pada Tabel I.

Tabel I. Hasil uji kesesuaian system

Parameter	Hasil Uji Kesesuaian Sistem	Rekomendasi (Snyder <i>et al.</i> , 2010)
Faktor retensi (k)	72,300	$k > 2$
Resolusi (R_s)	2,108	$R_s > 2$
Tailing factor (TF)	1,639	$TF \leq 2$
Jumlah lempeng teoretis	7.719,505	$N > 2000$

Batas deteksi dan batas kuantifikasi

Batas deteksi dan batas kuantifikasi ditentukan berdasarkan pendekatan standar deviasi (Miller and Miller, 2010) sehingga diperoleh nilai batas deteksi dan batas kuantifikasi deksametason berturut-turut adalah 0,152 dan 0,509 $\mu\text{g/mL}$.

Kurva kalibrasi dan penentuan linieritas

Dari ketujuh seri larutan baku yang dibuat dengan konsentrasi 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0 dan 12,0 $\mu\text{g/mL}$ diperoleh kurva kalibrasi dengan persamaan $y=23868x-2139,6$ nilai koefisien korelasi (r) sebesar 0,9994.

Presisi dan akurasi sampel adisi

Uji presisi dan akurasi sampel adisi dilakukan untuk mengetahui pemenuhan parameter ketelitian serta ketepatan metode analisis untuk menetapkan kadar deksametason pada sampel pulveres. Metode analisis dikatakan presisi dan akurat jika hasil analisis pada level kadar berbeda menunjukkan keterulangan respon serta memiliki kedekatan kadar dengan sejumlah baku analit yang ditambahkan pada matriks sampel (*standard addition method*). Sejumlah tertentu baku analit ditambahkan ke dalam sampel serta dibuat dalam tiga level kadar. Dilakukan replikasi sebanyak tiga kali pada tiap level kadar yang dibuat. Pembuatan tiga level kadar adisi ini bertujuan untuk mendapatkan informasi ketelitian serta ketepatan metode analisis saat diaplikasikan pada analit dalam sampel dengan level kadar rendah, tengah, serta tinggi (The United States Pharmacopeial Convention, 2009).

Tabel II. Hasil Uji Presisi dan Akurasi *Intraday* dan *Interday* Analisis Deksametason dalam Sampel Pulveres

Intraday				
Konsentrasi Deksametason ($\mu\text{g/mL}$)		SD	RSD (%)	Recovery (%)
Ditambahkan	Diperoleh			
2,000	1,910	0,055	2,873	95,500
4,000	3,857	0,292	7,569	96,425
6,000	5,695	0,169	2,964	94,917
Interday				
Konsentrasi Deksametason ($\mu\text{g/mL}$)		SD	RSD (%)	Recovery (%)
Ditambahkan	Diperoleh			
2,000	1,920	0,011	0,550	96,019
4,000	3,926	0,077	1,956	98,157
6,000	5,708	0,034	0,589	95,140

Dari Tabel II, uji presisi dan akurasi baik *intraday* maupun *interday* pada tiga level konsentrasi memiliki nilai persen RSD dan recovery dibawah nilai yang dipersyaratkan menurut AOAC (Gonzalez and Herrador, 2007). Hal ini menunjukkan bahwa metode analisis deksametason dinyatakan telah memenuhi parameter presisi dan akurasi baik *intraday* maupun *interday*.

Uji keseragaman kadar deksametason dalam sampel

Metode analisis deksametason yang telah tervalidasi dapat dijadikan metode analisis rutin yang sederhana, ekonomis, cepat, presisi dan akurat, serta efisien digunakan dalam kontrol kualitas sediaan racikan yang mengandung deksametason dalam peresapan bersama dengan CTM. Uji keseragaman kadar deksametason dalam sampel dapat dilakukan dengan pengambilan enam sampel masing-masing dari apotek dan rumah sakit untuk ditetapkan kadarnya. Dari keenam sampel sediaan racikan apotek yang diuji diperoleh kadar deksametason berturut-turut: 0,147; 0,168; 0,145; 0,148; 0,167; dan 0,144 % (b/b) dengan rata-rata kadar deksametason dalam sampel sebesar $0,153 \pm 0,011$ % (b/b) dan persen nilai penerimaan sebesar 2,69%. Dari keenam sampel sediaan racikan rumah sakit yang diuji diperoleh kadar deksametason berturut-turut: 0,114; 0,186; 0,177; 0,177; 0,177; dan 0,171 % (b/b) dengan rata-rata kadar deksametason dalam sampel sebesar $0,167 \pm 0,026$ % (b/b) dan persen nilai penerimaan sebesar 6,34%. Dari hasil tersebut dan berdasarkan kriteria penerimaan keseragaman sediaan pada FI V (Dirjen POM RI, 2014) maka dapat disimpulkan bahwa sediaan racikan pulveres mengandung deksametason yang diracik di apotek dan rumah sakit tersebut sudah memenuhi keseragaman sediaan.

Pengembangan metode analisis deksametason secara KCKT telah banyak dilakukan (Darwish *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2011). Meskipun demikian penelitian tentang analisis deksametason pada sediaan yang khusus masih terbatas dilaporkan. Pengembangan metode analisis deksametason secara KCKT yang khusus bagi suatu jenis sediaan pernah dilakukan pada sediaan mikroemulsi (Urban *et al.*, 2009), tetes mata (Razzaq *et al.*, 2013), tablet dan kapsul (Alzoman, 2016). Oleh karena itu, metode yang dikembangkan pada penelitian ini berkontribusi mendukung suatu analisis rutin dalam upaya kontrol kualitas sediaan racikan yang mengandung deksametason.

KESIMPULAN

Uji keseragaman kadar deksametason dalam sediaan racikan pulveres dapat dilakukan dengan metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) fase terbalik yang tervalidasi. Kondisi tersebut mendukung suatu metode analisis yang memenuhi parameter kesesuaian sistem, linieritas, batas deteksi, batas kuantifikasi, akurasi dan presisi. Hasil uji keseragaman kadar deksametason pada sediaan racikan pulveres baik yang diracik pada apotek maupun rumah sakit menunjukkan keseragaman sediaan. Meskipun demikian, perlu dikembangkan metode untuk menganalisis sediaan racikan yang mengandung deksametason dalam kombinasi dengan senyawa yang lain. Selain itu, perlu dilakukan penambahan lokasi pengambilan sampel supaya didapat hasil yang lebih representatif.

UCAPAN TERIMAKASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat, Universitas Sanata Dharma yang telah membiayai penelitian ini melalui Hibah Penelitian Dosen Muda tahun anggaran 2016.

DAFTAR PUSTAKA

- Akhoundi-Khalafi, A.M. and Shishehbore, M.R., 2015. A New Technique for Quantitative Determination of Dexamethasone in Pharmaceutical and Biological Samples Using Kinetic Spectrophotometric Method. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2015: 1–6.
- Allen, L. V and Ansel, H.C., 2014. Section II. Drug dosage form and drug delivery system design. Chapter 4. Dosage form design: Pharmaceutical and formulation consideration. *In: Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Tenth Ed.* 102–165.
- Alzoman, N., 2016. A Validated Stability-Indicating and Stereoselective HPLC Method for the Determination of Lenalidomide Enantiomers in Bulk Form and Capsules, *Journal of*

- Chromatographic Science*, 54(5), 730-735.
- Assante, J., Collins, S., and Hewer, I., 2015. Infection Associated With Single-Dose Dexamethasone for Prevention of Postoperative Nausea and Vomiting: A Literature Review, 83 (4), 281–288
- Bellis, J.R., Pirmohamed, M., Nunn, A.J., Loke, Y.K., De, S., Golder, S., and Kirkham, J.J., 2014. Dexamethasone and haemorrhage risk in paediatric tonsillectomy: A systematic review and meta-analysis. *British Journal of Anaesthesia*, 113 (1): 23–42.
- Darwish, W., Metwally, F.H., and Bayoumi, A. El, 2015. Development of Three Methods for Simultaneous Quantitative Determination of Chlorpheniramine Maleate and Dexamethasone in the Presence of Parabens in Oral. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 14 (1): 153–161.
- Dirjen POM RI, 2014. *Farmakope Indonesia edisi V*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- Friedrich, R.B., Ravanallo, A., Cichota, L.C., Rolim, C.M.B., and Beck, R.C.R., 2009. Validation of a simple and rapid uv spectrophotometric method for dexamethasone assay in tablets. *Quimica Nova*, 32 (4): 1052–1054.
- Gonzalez, A.G. and Herrador, M.A., 2007. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 26(3): 227–238.
- Jackson, M. and Lowey, A., 2010. *Handbook of Extemporaneous Preparation A guide to pharmaceutical compounding*. Pharmaceutical Press. London, UK: Pharmaceutical Press.
- Keeney, G.E., Gray, M.P., Morrison, A.K., Levas, M.N., Kessler, E.A., Hill, G.D., Gorelick, M.H., and Jackson, J.L., 2014. Dexamethasone for Acute Asthma Exacerbations in Children: A Meta-analysis. *Pediatrics*, 133 (3): 493–499.
- Miller, J.M. and Miller, J.C., 2010. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Technometrics.
- Rao, J.R., Mulla, T.S., Yadav, S.S., Rajput, M.P., and BHarekar, V. V., 2012. Validated HPTLC Method For Simultaneous Estimation Of Ciprofloxacin Hydrochloride And Dexamethasone In Bulk Drug And Formulation. *Int.J.ChemTech Res*, 4 (4): 1589–1594.
- Razzaq, S.N., Ashfaq, M., Mariam, I., Khan, I.U., and Razzaq, S.S., 2013. Simultaneous RP-HPLC determination of sparfloxacin and dexamethasone in pharmaceutical formulations. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49 (2), 301–309.
- Shah, V.P., Midha, K.K., Findlay, J.W.A., Hill, H.M., Hulse, J.D., McGilveray, I.J., McKay, G., Miller, K.J., Patnaik, R.N., Powell, M.L., Tonelli, A., Viswanathan, C.T., and Yacobi, A., 2000. Bioanalytical Method Validation - A Revisit with a Decade of Progress. *Pharmaceutical Research*, 17(12): 1551–1557.
- Snyder, L.R., Kirkland, J.J., and Dolan, J.W., 2010. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. Introduction to Modern Liquid Chromatography.
- The United States Pharmacopeial Convention, 2009. Pharmacists' Pharmacopeia. *United States Pharmacopeia and National Formulary*, author. Rockville: United States Pharmacopeial Convention Inc; 2002. USP 25, NF 19., 131.
- Urban, M.C.C., Mainardes, R.M., Gremião, M.P.D., Development and validation of HPLC method for analysis of dexamethasone acetate in microemulsions, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45(1): 87-92.
- Waldron, N.H., Jones, C.A., Gan, T.J., Allen, T.K., and Habib, A.S., 2012. Impact of perioperative dexamethasone on postoperative analgesia and side-effects: systematic review and meta-analysis. *British Journal of Anaesthesia*, 110(2): 191–200.
- Wisnuwardhani, H.A., Fidrianny, I., and Ibrahim, S., 2013. Method Development for Simultaneous Analysis of Steroid and Non-Steroid Antiinflammatory Substances in Jamu Pegal Linu Using Tlc-Spectrophotodensitometry. *Int.J.Pharm.Pharm.Sci.*, 5(4): 749–753.
- Zhang, M., Moore, G.A., Jensen, B.P., Begg, E.J., and Bird, P.A., 2011. Determination of dexamethasone and dexamethasone sodium phosphate in human plasma and cochlear perilymph by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 879(1): 17–24.

