

## ANALITIKA HIDROKORTIZON-ACETATA U MASTIMA ZA OČI PRIMENOM REVERZNO-FAZNE TEČNE HROMATOGRAFIJE POD VISOKIM PRITISKOM

MARIJA JOVOVIĆ<sup>1</sup>, DARKO IVANOVIĆ<sup>2</sup>, BILJANA JANČIĆ<sup>2\*</sup>  
ANĐELIJA MALENOVIĆ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Apoteka Kliničkog centra Srbije, Višegradska 26, Beograd, Srbija i Crna Gora

<sup>2</sup> Institut za farmaceutsku hemiju i analitiku lekova, Farmaceutski fakultet,  
Vojvode Stepe 450, Beograd, Srbija i Crna Gora

### Kratak sadržaj

Postavljena je metoda reverzno-fazne tečne hromatografije pod visokim pritiskom (RP-HPLC) za analizu hidrokortizon-acetata u mastima za oči. Analiza je izvršena na hromatografskom sistemu *Hewlett Packard* 1100 koji čine HP 1100 binarna pumpa, HP 1100 UV-VIS detektor i HP ChemStation za automatsku obradu podataka. Postupak je obuhvatio izbor odgovarajućih hromatografskih uslova, izbor pogodnog postupka ekstrakcije hidrokortizon-acetata iz masti, kao i validaciju metode. Za hromatografsku analizu odabrana je kolona Bio-Sil C<sub>18</sub> 250 mm x 4,6 mm, 5µm veličine čestica, termostatirana na 30,5°C. Volumen injiciranja bio je 20 µL. Mobilnu fazu činila je smeša metanol-voda (75 : 25 V/V) čiji je pH podešen na 4,0 sa 85%-tnom ortofosfatnom kiselinom. Protok mobilne faze bio je 1,15 ml/min., a talasna dužina detekcije 254 nm. Kao interni standard korišćen je mometazon-furoat. Postavljena RP-HPLC metoda je validirana, tj.

---

\* Autor za korespondenciju

Institut za farmaceutsku hemiju i analitiku lekova, Farmaceutski fakultet,  
Vojvode Stepe 450, Beograd, Srbija i Crna Gora

tel: 011/ 39-70-379/733; fax: 011/ 39-72-840; e-mail: biljanaj@pharmacy.bg.ac.yu

ispitana je robusnost, selektivnost, linearnost, tačnost, preciznost – ponovljivost i određeni su limit detekcije i limit kvantifikacije. Kako je predložena metoda pouzdana i robusna može se koristiti u rutinskoj analizi doziranih oblika koji sadrže hidrokortizon–acetat.

**Ključne reči:** validacija, hidrokortizon–acetat, ekstrakcija, RP–HPLC

## Uvod

Hidrokortizon–acetat predstavlja acetatni estar prirodnog glikokortikoida hidrokortizona čije je antiinflamatorno dejstvo osnovna indikacija za lokalnu primenu. U oftalmologiji se koristi u obliku 1% kapi kao i 0,5%, 1% i 2,5% masti za oči. Hemijski je 11 $\beta$ , 17, 21–trihidroksipregn–4en–3,20–dion 21–il acetat (1). Oficinalan je prema propisu mnogih farmakopeja: Ph. Eur., USP, BP, DAB, Aust., Belg., Jap., itd. (2), koje za određivanje sadržaja propisuju uglavnom UV spektrofotometrijsku ili HPLC metodu.

Pregledom literature nađeno je da su za određivanje hidrokortizon–acetata korišćene indirektna (3–6) i direktna spektrofotometrija nakon čvrsto–tečne ekstrakcije (7), kao i metoda derivativne spektrofotometrije (8, 9). HPLC metoda je predložena za analizu hidrokortizon–acetata samog ili u smeši sa drugim supstancijama (10–12). Za potvrđivanje prisustva hidrokortizona u hrani (13), kao i za određivanje sadržaja u serumu (14) i urinu (15) korišćena je RP–HPLC metoda.

Cilj ovog rada bio je da se definišu optimalni hromatografski uslovi (kolona, sastav mobilne faze, protok, temperatura) za određivanje hidrokortizon–acetata, zatim da se izvrši validacija postavljene metode (ispitivanje robusnosti, selektivnosti, linearnosti, preciznosti, tačnosti, određivanje limita detekcije–LOD i limita kvantifikacije–LOQ), kao i da se postavi odgovarajući postupak ekstrakcije ispitivane komponente iz masti za oči.

## **Aparatura i reagensi**

**Hemikalije.** Svi korišćeni reagensi bili su HPLC čistoće. Za pripremu mobilne faze korišćeni su metanol – gradient grade (*Merck*, Darmstadt, Germany), HPLC grade voda i 85%–tna ortofosfatna kiselina (*Carlo Erba*, Milano, Italy).

**Standardi i uzorci.** Hidrokortizon–acetat i mometazon–furoat su USP referentni standardi. Uzorak je 1% *Hydrocortisoni oculentum* izrađen kao sterilni preparat u Galenskoj laboratoriji Apoteke KCS, Beograd, Srbija i Crna Gora.

**Hromatografski uslovi.** Hromatografski sistem *Hewlett Packard* 1100 koji čini HP 1100 binarna pumpa, HP 1100 UV-VIS detektor i HP ChemStation za automatsku obradu podataka korišćen je za hromatografsko ispitivanje. Separacija je postignuta na koloni Bio–Sil C<sub>18</sub> 250 mm x 4.6 mm, 5 µm veličine čestica pri temperaturi od 30,5°C. Volumen injiciranja bio je 20 µL. Mobilna faza bila je smeša metanol–voda (75 : 25 V/V) čiji je pH podešen na 4,0 sa 85 %-tnom ortofosfatnom kiselinom. Mobilna faza filtrirana je kroz 0,2 µm Millipore filter i deaerizovana u ultrazvučnom kupatilu (UZK) u trajanju od 30 minuta Protok je bio 1,15 ml/min., a talasna dužina detekcije 254 nm. Kao interni standard korišćeno je strukturno sličano jedinjenje, mometazon–furoat.

Statistička obrada podataka vršena je u programu Excel, Microsoft Word 98. Za izračunavanje matematičkog modela i konstruisanje 3–D dijagrama korišćen je program STATISTIKA 5.

### **Priprema rastvora internog standarda**

Odmereno je tačno 20 mg standardne supstancije mometazon–furoata, preneto u odmerni sud od 100 ml, rastvoreno u metanolu i sud dopunjen do oznake. Koncentracija rastvora je 0,2 mg/ml.

### **Priprema rastvora standarda za procenu linearnosti**

Odmereno je tačno 20 mg standardne supstancije hidrokortizon–acetata, preneto u odmerni sud od 100 ml, dodato 70 ml metanola, rastvoreno na UZK i sud dopunjen do oznake. Koncentracija rastvora je 0,2 mg/ml. Od ovog rastvora pripremljeni su, u mobilnoj fazi, rastvori koncentracija 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100 i 120 µg/ml. Svakom

rastvoru dodat je interni standard, tako da je njegova koncentracija u pripremljenim rastvorima 40 µg/ml.

Rastvori su injektovani po tri puta pod datim hromatografskim uslovima i određene su površine pikova.

#### **Priprema rastvora standarda za procenu preciznosti**

Odmereno je tačno 20 mg standardne supstancije hidrokortizon–acetata, preneto u odmerni sud od 100 ml, dodato 70 ml metanola, rastvoreno na UZK i sud dopunjen do oznake. Koncentracija rastvora je 0,2 mg/ml. Od ovog rastvora, u mobilnoj fazi, pripremljeni su rastvori koncentracija 50, 60 i 70 µg/ml. Svakom rastvoru dodat je interni standard, tako da je njegova koncentracija u pripremljenim rastvorima 40 µg/ml.

Pripremljeno je po 10 rastvora za svaku koncentraciju i rastvori su injektovani pod navedenim hromatografskim uslovima, a zatim su određene površine pikova.

#### **Priprema rastvora uzorka**

Odmereno je 2,0 g masti (1,0 g masti sadrži 10 mg hidrokortizon–acetata) i rastvoreno u 100 ml zagrejanog *n*-heksana. Nakon hlađenja izvršena je ekstrakcija sa 20 ml prethodno pripremljene smeše metanol–15% natrijum–hlorid (3:1 V/V). Odvojena je vodena faza i ekstrakcija ponovljena još dva puta sa po 10 ml iste smeše. Spojene vodene, faze kvantitativno su prenete u odmerni sud od 50 ml i mobilnom fazom i sud je dopunjen do oznake. Koncentracija hidrokortizon–acetata je 0,4 mg/ml. Od ovog rastvora pripremljen je rastvor koji sadrži 60 µg/ml hidrokortizon–acetata i 40 µg/ml internog standarda.

Pripremljeno je po 10 rastvora za svaku koncentraciju i rastvori su injektovani pod navedenim hromatografskim uslovima, a zatim su određene površine pikova.

#### **Priprema rastvora standarda za procenu tačnosti metode**

U odmerena 2 g *placebo* uzorka dodato je 5,0 ml rastvora standardne supstancije hidrokortizon–acetata koncentracije 2,0 mg/ml i izvršena homogenizacija. Ekstrakcija je izvršena prema postupku opisanom kod pripreme rastvora uzorka. Od dobijenog rastvora

hidrokortizon–acetata, koncentracije 0,2 mg/ml, u mobilnoj fazi, pripremljeni su rastvori koncentracija 48 µg/ml, 60 µg/ml i 72 µg/ml. Svakom rastvoru dodat je interni standard, tako da je njegova koncentracija u pripremljenim rastvorima 40 µg/ml.

Postupak ekstrakcije ponovljen je tri puta i za svaku koncentraciju pripremljena su po tri rastvora.

### Rezultati

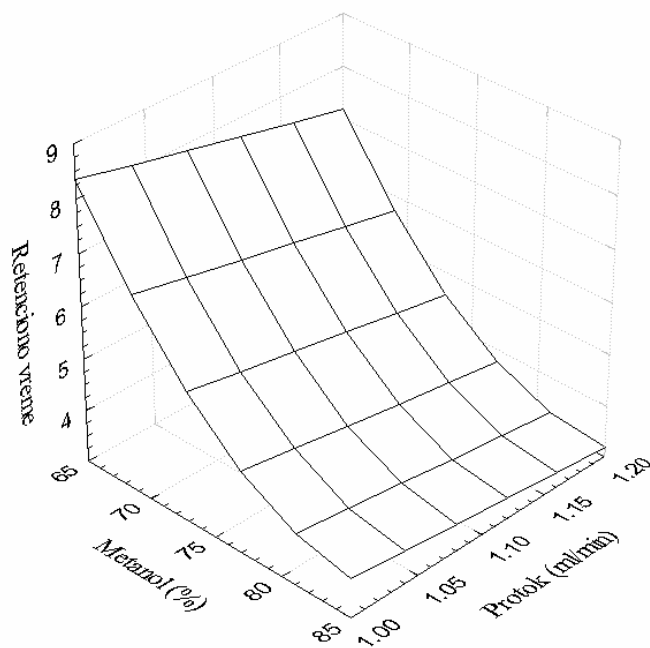
Da bi se definisali optimalni hromatografski uslovi za RP–HPLC analizu hidrokortizon–acetata, a na osnovu preliminarnih testova, izvršena je optimizacija uticaja sadržaja metanola i protoka mobilne faze. Rezultati za faktor kapaciteta hidrokortizon–acetata prikazani su u tabeli I.

**Tabela I** Uticaj sadržaja metanola i protoka mobilne faze na retenciono vreme hidrokortizon–acetata

**Table I** Influence of methanol content and flow rate on retention behavior of hydrocortisone acetate

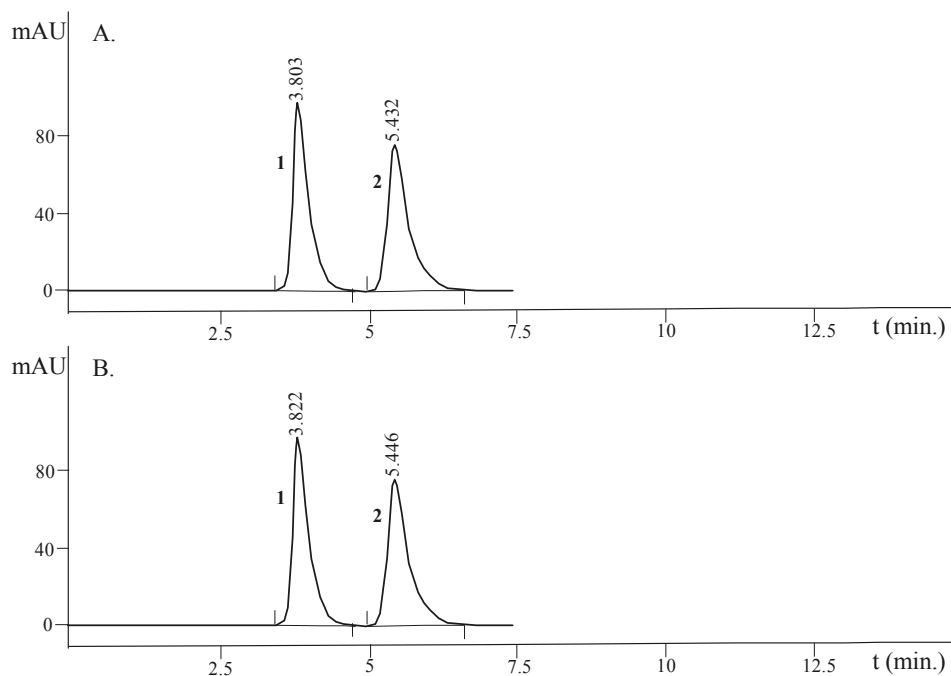
Protok mobilne faze Flow rate (ml/min)	Sadržaj metanola Methanol content (%)				
	65	70	75	80	85
1,00	8,369	6,233	5,066	4,173	3,728
1,05	8,228	5,943	4,826	3,983	3,556
1,10	7,871	5,678	4,616	3,803	3,395
1,15	7,525	5,44	4,419	3,635	3,246
1,20	7,218	5,225	4,233	3,489	3,112

Na osnovu rezultata konstruisan je 3-D dijagram  $t_r=f(\text{protok, \% metanola})$  i prikazan na slici 1.



**Slika 1. 3-D dijagram  $t_r=f(\text{protok, \% metanola})$**   
**Figure 1. Three-D graph  $t_r = f(\text{flow rate, \% Methanol})$**

Pod definisanim optimalnim uslovima izvršena je hromatografska analiza, a reprezentativni hromatogram prikazan na slici 2.



**Slika 2. Reprezentativni hromatogram**

**A. smeša standarda hidrokortizon–acetata (1) i mometazon–furoata (2) i**

**B. uzorka masti sa hidrokortizon–acetatom (mobilna faza: metanol–voda (75:25 V/V), pH 4,0 podešen sa 85%–tnom ortofosfatnom kiselinom, protok: 1,15 ml/min.; temperatura 30,5°C; talasna dužina 254 nm)**

**Figure 2. Representative chromatogram of**

**A. Laboratory mixture of hydrocortisone acetate (1) and mometasone furoate (2) and**

**B. Sample (mobile phase: methanol–water (75:25 V/V) pH 4.0 adjusted with 85% orthophosphoric acid; flow rate 1.15 ml/min.; temperature 30.5°C; UV detection 254 nm)**

U opsegu koncentracija od 10–120  $\mu\text{g/ml}$  ispitana je linearnost metode. Rezultati za linearnost metode dati su u tabeli II.

**Tabela II** Značajni parametri kalibracione krive hidrokortizon-acetata

**Table II** The important parameters for the calibration curve of hydrocortisone acetate

Komponenta Compound	Opseg koncentracija Concentration range ( $\mu\text{g/ml}$ )	$y = ax + b$	r	$S_b$	$t_b$
Hidrokortizon-acetat	10–120	0,0160x–0,055	0,9999	0,0071	1,21

r – koeficijent korelacije;

$S_b$  – standardna devijacija odsečka;

$t_b$  – izračunata vrednost studentovog t–testa za procenu značajnosti odsečka na ordinati

Ispitana je preciznost–ponovljivost metode i rezultati su prikazani u tabeli III.

**Tabela III** Procena preciznosti RP–HPLC metode

**Table III** Precision of the RP–HPLC method

Komponenta Compound	Injektovano Injected ( $\mu\text{g/ml}$ )	Nađeno Found ( $\mu\text{g/ml}$ )	CV (%)	Recovery (%)
Hidrokortizon–acetat	50	51,53 $\pm$ 0,29*	0,6	103,0
	60	60,80 $\pm$ 0,82	1,0	101,3
	70	71,67 $\pm$ 0,71	1,0	102,4

\*S (n=10)

Postavljena metoda primenjena je za određivanje sadržaja hidrokortizon–acetata u mastima za oči, a dobijene vrednosti za sadržaj, izražene kroz *Recovery* vrednosti, prikazane su u tabeli IV.



**Tabela IV** Određivanje sadržaja hidrokortizon–acetata u mastima za oči

**Table IV** Determination of hydrocortisone acetate content in eye ointment

<b>Uzeto Taken (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>Nađeno Found (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>Nađeno Found (%)</b>	<b>CV (%)</b>	<b>R (%)</b>
60	$56,24 \pm 0,94^*$	0,94	1,7	94

\*S (n=10)

Rezultati dobijeni za procenu tačnosti metode dati su u tabeli V.

**Tabela V** Procena tačnosti RP–HPLC metode

**Table V** Accuracy of the RP–HPLC method

<b>Komponenta Compound</b>	<b>Uzeto Taken (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>Nađeno Found (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>CV (%)</b>	<b>Recovery (%)</b>
	48	$47,47 \pm 0,15^*$	0,3	98,9
Hidrokortizon- acetat	60	$56,90 \pm 0,15$	0,2	94,8
	72	$70,11 \pm 0,55$	0,8	97,4

\*S (n=10)

## Diskusija

Hidrokortizon-acetat je jedinjenje steroidne strukture. Analiza jedinjenja ovakve strukture primenom HPLC tehnike podrazumeva primenu mobilnih faza sa velikim procentom organskog modifikatora (> 75%) kako bi se postiglo optimalno vreme separacije i odgovarajuća simetrija pika. S obzirom na nepolarost ispitivanog jedinjenja za

ispitivanje hromatografskog ponašanja ovog steroida izabrane su nepolarne oktil (C<sub>8</sub>) i oktadecil (C<sub>18</sub>) stacionarne faze. Izvršeno je poređenje hromatografskog ponašanja ispitivanog jedinjenja na C<sub>8</sub> (250 × 4,6 mm, 5 μm veličine čestica) i C<sub>18</sub> (250 × 4,6 mm, 5 μm veličine čestica) koloni. Pri sadržaju metanola većem od 80% na C<sub>8</sub> koloni dobijen je asimetričan pik, pa kako su na C<sub>18</sub> koloni dobijeni bolji rezultati ova kolona je korišćena u daljim ispitivanjima

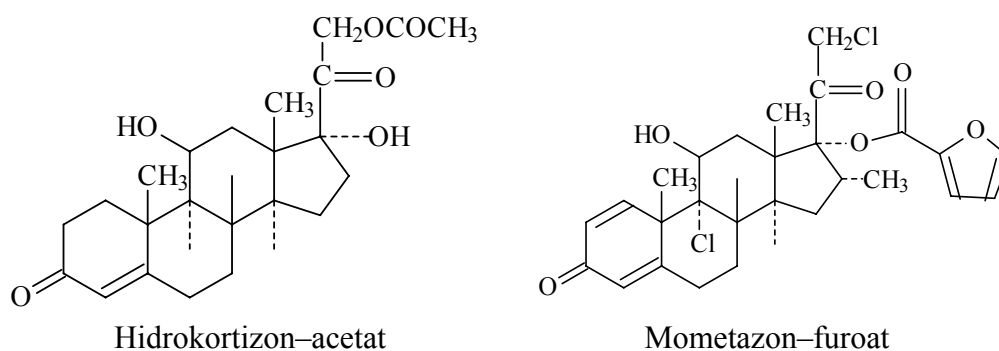
Preliminarna ispitivanja pokazala su da je najveći uticaj sadržaja metanola i protoka mobilne faze, dok su promene ostalih faktora (pH mobilne faze, temperatura) imale mali uticaj na hromatografsko ponašanje hidrokortizon–acetata. Da bi se utvrdilo koji je odgovarajući procenat metanola u mobilnoj fazi i odgovarajući protok, izvršena je optimizacija primenom *metode površine odgovora* (Response Surface Methodology – RSM). Postupak podrazumeva da se svi ostali faktori drže na jednom, već definisanom i tačno određenom nivou, dok se druga dva faktora istovremeno menjaju. Ovaj pristup optimizaciji metode omogućava da se definišu uticaji ispitivanih faktora kao i njihove međusobne interakcije. U skladu s tim, pripremljene su mobilne faze sa 65%, 70%, 75%, 80% i 85% metanola čiji je pH podešen na 4,0 sa 85%–tnom ortofosfatnom kiselinom. Protok mobilne faze menjan je u malom intervalu (1,0 ml/min., 1,05 ml/min., 1,1 ml/min., 1,15 ml/min. i 1,20 ml/min.). Temperatura kolone bila je 30,5°C. Kao parametar za praćenje hromatografskog ponašanja hidrokortizon–acetata izabrano je retenciono vreme. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli I, dok slika 1 pokazuje trodimenzionalnu zavisnost  $t_r=f$  (protok, % metanola). Na osnovu dobijenih rezultata izračunati su koeficijenti polinoma drugog reda (jednačina 1).

$$z=108,018-2,067x-27,848y+0,011x^2+0,192xy+4,029y^2 \quad (\text{Jed 1.})$$

gde z–predstavlja retenciono vreme hidrokortizon–acetata,  
x–protok mobilne faze i  
y–sadržaj metanola u mobilnoj fazi izražen u %.

Na osnovu dobijenih rezultata jasno se vidi da povećanje protoka i sadržaja metanola imaju veliki uticaj na retenciono ponašanje analizirane supstancije. Može se zaključiti da je optimalno zadržavanje hidrokortizon–acetata na koloni pri protoku od 1,10 do 1,15 ml/min i sadržaju metanola oko 75%. Za hromatografku analizu izabrana je mobilna faza sa 75% metanola, jer veći sadržaj metanola dovodi u pitanje rentabilnost RP–HPLC metode, s jedne strane, dok se s druge strane ne dobijaju bitno bolji rezultati. U postupku optimizacije ujedno je ispitana i robusnost metode, odnosno njena sposobnost da se „odupre” malim, namernim promenama hromatografskih uslova. Ispitivanje robusnosti metode je deo validacionog postupka i prema najnovijim literaturnim podacima mora se izvršiti pre ostalih ispitivanja (16). Potvrđeno je da pH mobilne faze i temperatura nemaju uticaja na određivanje, ali se protok mobilne faze i sadržaj metanola moraju držati u tačno definisanim granicama.

Optimalni hromatografski uslovi za određivanje sadržaja hidrokortizon–acetata su mobilna faza metanol–voda (75:25 V/V) čiji je pH podešen na 4,0 sa 85%–tnom ortofosfatnom kiselinom, pri protoku 1,15 ml/min., a talasna dužina detekcije je 254 nm. Za interni standard izabran je steroidni estar mometazon–furoat. Strukturne formule hidrokortizon–acetata i mometazon–furoata prikazane su na šemi 1.



Šema 1.  
Schema 1.

Pod ovim uslovima retencionna vremena bila su: za hidrokortizon–acetat 3,783 min. i mometazon–furoat 5,417 min. Faktor kapaciteta ( $k'$ ) za hidrokortizon–acetat je 2,050 što ukazuje na optimalno vreme zadržavanja komponente na stacionarnoj fazi. Između hidrokortizon–acetata i internog standarda postignuta je zadovoljavajuća separacija što je potvrđeno izračunavanjem faktora selektivnosti  $\alpha$  koji iznosi 1,643.

Postavljena RP–HPLC metoda je validirana, tj. definisana je selektivnost, linearnost, preciznost, tačnost, određeni su LOD i LOQ, kao i postupak ekstrakcije hidrokortizona–acetata iz masti. Kako bi se potvrdila pouzdanost metode i mogućnost dobijanja pouzdanih rezultata, validacija metode predstavlja postupak od presudnog značaja.

Selektivnost metode potvrđena je injektovanjem ekstrakta *placebo* uzorka (sadrži sve sem aktivne komponente) i smeše standarda. Poređenjem dobijenih hromatograma zaključeno je da je postavljena metoda selektivna, jer se na hromatogramu *placebo* uzorka na retencionim vremenima koja odgovaraju hidrokortizon–acetatu i mometazon–furoatu ne javljaju interferirajući pikovi.

Linearnost metode analizirana je u opsegu koncentracija od 10–120  $\mu\text{g/ml}$ . Dobijeni rezultati, prikazani u tabeli II, potvrđuju dobru linearnost metode. Za injektovane rastvore izračunat je faktor odgovora detektora.

Preciznost metode procenjena je u tri tačke, za koncentracije 50, 60 i 70  $\mu\text{g/ml}$ . Rezultati dobijeni za *Recovery* (R), koeficijent varijacije (CV) i standardnu devijaciju za sve tri ispitane koncentracije ukazuju na dobru preciznost metode (Tabela III).

Validirana RP–HPLC metoda, nakon odgovarajućeg postupka ekstrakcije, primenjena je za određivanje sadržaja hidrokortizon–acetata u mastima za oči. Dobijeni sadržaj izražen kroz vrednost R (Tabela IV) odgovara farmakopejskim zahtevima, tj. da sadržaj mora biti od 90% do 110%.

Prema ICH zahtevima tačnost metode procenjena je „opterećivanjem” *placebo* uzorka sa 80%, 100% i 120% u odnosu na deklarisan sadržaj hidrokortizon–acetata. Dobijene vrednosti za R (od 94,8% do 98,9%) i za CV (od 0,2 % do 0,8%) potvrđuju dobru tačnost metode (Tabela V).

Vrednosti limita kvantifikacije (LOQ) i limita detekcije (LOD) hidrokortizon–acetata eksperimentalno su određene, a dobijene vrednosti iznose: LOQ = 1,0 µg/ml; LOD = 0,15 µg/ml.

### **Zaključak**

Predložena RP–HPLC metoda predstavlja brzu, jednostavnu i selektivnu metodu za analizu hidrokortizon–acetata u mastima za oči. Validacijom metode prema ICH zahtevima potvrđena je selektivnost, linearnost, preciznost i tačnost metode. Sem toga, tačno je definisan postupak ekstrakcije ispitivanog jedinjenja iz masne podloge što je od velikog značaja za rutinsku analizu. Metoda je pouzdana, a optimizacijom je ujedno ispitana i robusnost metode, pa se prikazana metoda može primeniti za određivanje hidrokortizon–acetata ne samo u mastima za oči već i u drugim farmaceutskim preparatima.

# ANALYSIS OF HYDROCORTISONE ACETATE IN EYE OINTMENT APPLYING REVERSED-PHASE HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD

MARIJA JOVOVIĆ<sup>1</sup>, DARKO IVANOVIĆ<sup>2</sup>, BILJANA JANČIĆ<sup>2\*</sup>,  
ANĐELIJA MALENOVIĆ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Clinical Center of Serbia, Pharmacy and Medical Supplies, Višegradska 26, Belgrade, Serbia & Montenegro*

<sup>2</sup> *Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Analysis, Faculty of Pharmacy, Vojvode Stepe 450, Belgrade, Serbia & Montenegro*

## **Abstract**

In this paper the reversed-phase high performance liquid chromatographic method (RP-HPLC) was applied for the determination of hydrocortisone acetate in eye ointment. Analysis were performed on the chromatographic system *Hewlett Packard* 1100 which consisted of a HP 1100 pump, HP 1100 UV-VIS Detector and HP ChemStation integrator. Separations were performed on a Bio-Sil C<sub>18</sub> 250 mm x 4,6 mm, 5µm particle size column at 30.5 °C. The samples were introduced through a Rheodyne injector valve with a 20 µL sample loop. Methanol – water (75:25 V/V) was used as a mobile phase, at flow rate 1.15 mL/min and pH was adjusted to 4.0 with orthophosphoric acid. UV detection was performed at 254 nm. Mometasone furoate was used as an internal standard. Developed RP-HPLC method was validated and all the validation parameters of the method are given. The proposed method is rapid, accurate, selective and because of its sensitivity and reproducibility, it may be used in routine control of pharmaceutical dosage forms which contain hydrocortisone acetate.

**Key words:** validation, hydrocortisone acetate, extraction,  
RP-HPLC

## Literatura

1. The Merck index, Twelfth edition, MERCK & CO., Inc., Whitehouse Station, N. J., 1996.
2. Martindale, The Extra Pharmacopoeia, 31<sup>st</sup> edition, James EF Reynolds, Royal Pharmaceutical Society, London 1996.
3. Valash MI, Zakhari NA, Rizk M, Toubar S. UV spectrophotometric determination of delta 4,3-oxosteroid using semicarbazide. *Farmaco Ed Prat* 1987; 42:81-90.
4. Živanović Lj, Živanov-Stakić D. Spektrofotometrijsko određivanje prednizona, hidrokortizona, dezoksimetazona i dezoksikortikosterona reakcijom sa 4-acetilaminobenzaldehid semitiokarbazonom. *Arh Farm* 1987; 5:217-222.
5. Grote M, Kezzrup A. Reduction of a new water-soluble tetrazolium salt by steroids and ascorbic acid. *Anal Chim Acta* 1988;1-2: 273-278.
6. Ayllon L, Silva M, Perez-Benedito D. Improved automatic kinetic method for the determination of various corticosteroids. *J Pharm Sci* 1994; 93: 1135-1141.
7. Bonazzi D, Andrisano V, Gatt R, Cavrini V. Analysis of pharmaceutical creams a useful approach based on solid-phase extraction (SPE) and UV-spectrophotometry. *J Pharm Biomed Anal* 1995; 13: 1321-1329.
8. Di Pietra AM, Andrisano V, Gotti R, Cavrini V. On-Line Post-Column Photochemical Derivatisation in Liquid-Chromatographic-Diode-Array Detection Analysis of Binary Drug Mixtures. *J Pharm Biomed Anal* 1996; 14: 1191-1199.
9. Medenica M, Ivanović D, Marković S, Malenović A, Jančić B. Second-Derivative Spectrophotometric Analysis of Lidocaine and Hydrocortisone Acetate in Suppositories. *Pharm Ind* 2003; 65: Rad u štampi.
10. Volin P. High-Performance Liquid-Chromatographic Analysis of Corticosteroids. *J Chrom B-Biom Appl* (1998); 807:219-227.
11. MiscickaM, Sadlej-Sosnowska N, Wilczynska-Wojutelewucz I. Determination of components of pharmaceutical mixtures with hydrocortisone by HPLC. *Acta Pol Pharm* 1990; 47:25-28.
12. Hajkova R., Solich P., Dvorak J., Sicha J. Simultaneous determination of methylparaben, propylparaben, hydrocortisone acetate and its degradation products in a topical cream by RP-HPLC. *J Pharm Biomed Anal* 2003; 32: 921-927.
13. Fiori M, Oierdominici E, Longo F, Brambilla G. Identification of Main Corticosteroids as Illegal Feed Additives in Milk Replacers by Liquid-Chromatography Atmospheric-Pressure Chemical-Ionization Mass Spectrometry. *J Chrom A* 1998; 807: 219-227.
14. Glowka FK, Hermann TW. RP-HPLC procedure for determination of Hydrocortisone in serum for use in pharmacokinetics. *Chem Anal* 1999; 44: 373-380.
15. Hay M, Mormed P. Improved determination of urinary cortizol and cortizone, or corticosterone and 11-dehydrocorticosterone by high-liquid chromatography with ultraviolet absorbancy detection. *J Chrom B* 1997; 702: 33-39.
16. Fabre H. Robustness testing in liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J Pharm Biomed Anal* 1996; 14: 1125-1132.