



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

“Desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía HPLC-UV/Vis para la cuantificación de dexametasona en plasma y su aplicación a un estudio de farmacocinética”

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

L. F. Osvaldo Rodríguez Martínez

Tutor: Dra. Helgi Helene Jung Cook

Facultad de Química

Ciudad de México, México, Febrero, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**Desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía
HPLC-UV/Vis para la cuantificación de dexametasona en plasma y
su aplicación a un estudio de farmacocinética**

**T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

L. F. Osvaldo Rodríguez Martínez



Ciudad de México, 2023.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE

Dra. Raquel López Arellano

VOCAL

Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez

VOCAL

M. en C. Juan Manuel Rodríguez

VOCAL

Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava

SECRETARIO

Dra. Yareli Rojas Aguirre

Tutora



Dra. Helgi Helene Jung Cook

Sustentante



L. F. Osvaldo Rodríguez Martínez

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Programa de Maestría en Ciencias Químicas.

A la Dra. Helgi Jung Cook por compartir conmigo su paciencia, conocimiento, experiencia y apoyarme a lo largo de la Maestría.

A CONACYT por la beca otorgada durante mis estudios de posgrado con número de CVU 1099928.

A los miembros de mi jurado, a la Dra. Raquel López Arellano, la Dra. Alma Revilla Vázquez, el M. en C. Juan Manuel Rodríguez, la Dra. Martha Macías Rubalcava y la Dra. Yareli Rojas Aguirre por sus comentarios y correcciones que mejoraron y enriquecieron esta tesis.

A la M. en C. Lourdes Mayet por sus consejos, apoyo y sugerencias durante la experimentación realizada.

A José Becerril, que por cuestiones del destino y la pandemia fue el único amigo que conocí en el laboratorio, gracias por tu ayuda y paciencia.

A mis padres y mi hermana por apoyo a lo largo de mi vida, los amo.

A mi novia Lupita por alegrarme durante días difíciles y su total apoyo.

A mis profesores y amigos, por darme las herramientas necesarias para ser un mejor profesionista y persona.

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 112 del departamento de Farmacia en el conjunto E, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	i
INDICE DE TABLAS.....	iii
INDICE DE FIGURAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	v
1. INTRODUCCIÓN.....	7
2. ANTECEDENTES	8
2.1 Neuroinflamación.....	8
2.2 Glucocorticoides	8
2.3 Dexametasona	9
2.3.1 Propiedades fisicoquímicas	9
2.3.2 Mecanismo de acción	10
2.3.3 Farmacocinética	11
2.4 Presentaciones farmacéuticas en el mercado y usos terapéuticos aprobados	12
2.5 Uso de la DEX para COVID-19.....	14
2.6 Administración de DEX por vía nasal.....	15
2.7 Validación de métodos	18
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	22
4. OBJETIVOS	23
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	23
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	23
5. PARTE EXPERIMENTAL	24
5.1 REACTIVOS Y EQUIPOS	24
5.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	24
5.2.1 Soluciones.....	25
5.2.2 Soluciones Stock.....	26
5.2.3 Soluciones estándar	26
5.2.3.1 Soluciones estándar de Dexametasona	26
5.2.3.2 Soluciones estándar de metilprednisolona	26
5.2.4 Curva de calibración	27
5.2.5 Muestras control	28
5.3 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO	29
5.3.1 Detección de la longitud de onda de máxima absorción	29
5.3.2 Selección de la fase móvil y el estándar interno	29
5.3.3 Selección del disolvente de extracción	30
5.3.4 Condiciones de extracción.....	31
5.4 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.....	32
5.4.1 Selectividad.....	32
5.4.2 Acarreo.....	33
5.4.3 Límite Inferior de cuantificación	33
5.4.4 Linealidad.....	33
5.4.5 Precisión	33
5.4.5.1 Repetibilidad.....	34
5.4.5.2 Reproducibilidad.....	34
5.4.6 Exactitud	34
5.4.7 Estabilidad.....	35

5.4.7.1	Estabilidad de la muestra procesada.....	35
5.4.7.2	Estabilidad en automuestreador	35
5.4.7.3	Estabilidad a corto plazo.....	35
5.4.7.4	Estabilidad a largo plazo.....	35
5.4.7.5	Estabilidad ciclos de congelación-descongelación.....	36
5.4.7.6	Estabilidad de las soluciones Stock.....	36
5.5	ANÁLISIS DE MUESTRAS DE VOLUNTARIOS	36
5.6	ANÁLISIS DE DATOS – PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS.....	37
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
6.1	Desarrollo del método analítico	38
6.1.1	Determinación de la longitud de onda máxima de absorción	38
6.1.2	Selección de la fase móvil y el estándar interno.	38
6.1.3	Selección del estándar interno.....	40
6.1.4	Selección del disolvente de extracción	43
6.1.5	Condiciones de extracción.....	43
6.1.6	Condiciones cromatográficas	45
6.2	Validación del método analítico	45
6.2.1	Selectividad.....	45
6.2.2	Acarreo.....	45
6.2.3	Límite Inferior de cuantificación	46
6.2.4	Linealidad.....	46
6.2.5	Precisión y exactitud.....	47
6.2.6	Estabilidad.....	48
6.2.7	Análisis de muestras de voluntarios	48
6.2.8	Análisis de datos	51
7.	CONCLUSIONES	56
8.	PERSPECTIVAS.....	57
9.	REFERENCIAS.....	58

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de la Dexametasona (DrugBank, 2022).	10
Tabla 2. Parámetros farmacocinéticos de dexametasona vía oral, intravenosa e intramuscular (Loew et al., 1986; Spoorenberg et al., 2014).	12
Tabla 3. Presentaciones farmacéuticas y usos terapéuticos (D.R. Consejo de Salubridad General. Comisión, 2017).	14
Tabla 4. Métodos analíticos cromatográficos reportados para la cuantificación de dexametasona (Chen et al., 2002; Harahap et al., 2009; Hempen et al., 2012; Razzaq et al., 2017; Song et al., 2004; Y. Yang et al., 2008).	17
Tabla 5. Comparación de los criterios para la validación entre NOM-177 y las guías de la FDA y EMA.	18
Tabla 5. Comparación de los criterios para la validación entre NOM-177 y las guías de la FDA y EMA, continuación.	19
Tabla 5. Comparación de los criterios para la validación entre NOM-177 y las guías de la FDA y EMA, continuación.	20
Tabla 5. Comparación de los criterios para la validación entre NOM-177 y las guías de la FDA y EMA, continuación.	21
Tabla 6. Preparación de soluciones de DEX para la curva de calibración.	26
Tabla 7. Curva de calibración de DEX en solución.	27
Tabla 8. Curva de calibración de DEX en plasma.	27
Tabla 9. Muestras control de DEX en solución	28
Tabla 10. Muestras control de DEX en plasma	29
Tabla 11. Factores evaluados para la extracción con la mezcla éter: diclorometano ...	32
Tabla 12. Comparación de propiedades fisicoquímicas de DEX y el EI (DrugBank, 2022).	41
Tabla 13. Condiciones evaluadas para la extracción de DEX de muestras de plasma.	44
Tabla 14. Condiciones cromatográficas	45
Tabla 15. Resultados obtenidos para la evaluación de selectividad y acarreo	46
Tabla 16. Linealidad del método analítico. Valores de porcentaje de desviación absoluta de la concentración calculada con respecto a la concentración nominal de DEX.	47
Tabla 17. Precisión del método desarrollado	47
Tabla 18. Exactitud del método desarrollado	47
Tabla 19. Estabilidad de DEX en plasma bajo distintas condiciones	48
Tabla 20. Estabilidad en solución de DEX y el EI	48
Tabla 21. Datos sujeto 1 - IV	49
Tabla 22. Datos sujeto 1 - IN	49
Tabla 23. Datos sujeto 2 - IV	49
Tabla 24. Datos sujeto 2 - IN	50
Tabla 25. Datos de las muestras control del análisis de voluntarios.	50
Tabla 26. Parámetros farmacocinético de la administración IV	52
Tabla 27. Datos farmacocinéticos de los voluntarios 1 y 2 ambas vías, modelo no compartimental	54

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la dexametasona (DrugBank, 2022)	10
Figura 2. Metabolismo de dexametasona (Gentile et al., 2015).	11
Figura 3. Diagrama de la preparación de solución para adecuabilidad	25
Figura 4. Diagrama del procedimiento de extracción	31
Figura 5. Máximo de absorción de DEX empleando un espectrómetro UV.....	38
Figura 6. Cromatograma de DEX en la fase móvil acetonitrilo: ácido acético 0.1% en agua (70:30 v/v)	38
Figura 7. Cromatograma de DEX en la fase móvil metanol: ácido acético 0.1% en agua (70:30 v/v)	39
Figura 8. Cromatograma de DEX en la fase móvil solución amortiguadora de fosfatos pH 3.0: Acetonitrilo (70:30 v/v)	39
Figura 9. Cromatograma de DEX en la fase móvil solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 7.0: Acetonitrilo (70:30 v/v).....	40
Figura 10. Cromatograma de DEX (1) y EI (2) en la fase móvil solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 7.0: acetonitrilo (60:40 v/v).....	40
Figura 11. Comparación de la estructura química de DEX (1) y EI (2) (DrugBank, 2022).	41
Figura 12. Cromatograma de DEX y Ondansetrón	42
Figura 13. Cromatograma de DEX (1) y Cortisona (2)	42
Figura 14. Cromatograma de DEX (1) y Lansoprazol (2)	42
Figura 15. Cromatograma de DEX (1) y Omeprazol (2)	43
Figura 16. Cromatograma de DEX (1) y MPS (2)	43
Figura 17. Diagrama del método de extracción empleado en el estudio	44
Figura 18. Cromatograma típico de una muestra blanco.	45
Figura 19. Curva promedio de calibración de DEX en plasma humano.	46
Figura 20. Cromatograma típico del voluntario 1 vía IV.	50
Figura 21. Cromatograma típico del voluntario 1 vía IN.	50
Figura 22. Cromatograma típico del voluntario 2 vía IV.	51
Figura 23. Cromatograma típico del voluntario 2 vía IN.	51
Figura 24. Ajuste de los datos del voluntario 1 a un modelo abierto de dos compartimentos después de la administración intravenosa de una dosis de 6 mg dexametasona.....	51
Figura 25. Ajuste de los datos del voluntario 2 a un modelo abierto de dos compartimentos después de la administración intravenosa de una dosis de 6 mg dexametasona.....	52
Figura 26. Sujeto 1 - IN. Modelo no compartimental	53
Figura 27. Sujeto 2 - IN. Modelo no compartimental.	53
Figura 28. Comparación IV vs IN. Voluntario 1	54
Figura 29. Comparación IV vs IN. Voluntario 2	55

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grado Celsius
ACN	Acetonitrilo
AUC	Del inglés, área bajo la curva
b	Ordenada al origen
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
C _{max}	Concentración plasmática máxima
COVID-19	Enfermedad por coronavirus del 2019
CV%	Coeficiente de variación porcentual
DEX	Dexametasona
EI	Estándar Interno
EMA	European Medicines Agency
FDA	Food & drugs administration
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
GC	Glucocorticoides
h	horas
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
IL	Interleucina
IN	Intranasal
IV	Intravenosa
Ke	Del inglés, constante de eliminación
K _m	Del inglés, constante metabólica
LIC	Límite inferior de cuantificación
LSC	Límite superior de cuantificación
µL	Microlitro
µg/mL	Microgramo por mililitro
m	Pendiente
MCB	Muestra control baja
MCM	Muestra control media
MCA	Muestra control alta
MeOH	Metanol
mg/mL	Miligramo por mililitro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MPS	Metilprednisolona
MTB	Metil terbutil éter
NF-kB	Del inglés, factor nuclear-kB
NFT	Del inglés, factor de necrosis tumoral
ng/mL	Nanogramo por mililitro
nm	nanómetros
NOM	Norma Oficial Mexicana
r	Coeficiente de correlación
r ²	Coeficiente de determinación
SARS-CoV-2	Coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave de tipo 2
t _{max}	Tiempo en el que se alcanza la concentración plasmática máxima
TMR	Tiempo medio de residencia
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UV	Ultravioleta

v/v
 V_{\max}

volumen/volumen
Velocidad máxima

1. INTRODUCCIÓN

La dexametasona (DEX) es un análogo sintético del cortisol, comúnmente utilizado en los siguientes tratamientos: edema cerebral secundario a tumores, neurocirugía, abscesos, asma grave aguda y estados alérgicos graves o incapacitantes, enfermedades dermatológicas agudas graves, enfermedades autoinmunes, artritis reumatoide activa y en la profilaxis y tratamiento de las náuseas y los vómitos inducidos por citostáticos dentro del ámbito de regímenes antiemético (D.R.Consejo de Salubridad General. Comisión, 2017).

En diciembre del 2019, surgió la emergencia sanitaria del COVID-19, y tras varios ensayos clínicos con corticosteroides en personas con COVID-19, se concluyó que la dexametasona (DEX) en dosis de 6 mg al día durante 10 días es la mejor terapia para tratar casos donde la enfermedad es severa, reduciendo el riesgo de mortalidad en un tercio para los pacientes con respiradores y una quinta parte para los pacientes con oxígeno (Noreen et al., 2021).

En el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), se ha demostrado que la DEX administrada por vía intranasal, alcanza el sistema nervioso central a través de nervio olfatorio reduciendo la neuroinflamación de forma más efectiva que cuando se aplica por vía intravenosa (Pérez-Osorio et al., 2021).

Adicionalmente, los estudios de biodistribución indicaron que la DEX se puede detectar tanto en sistema nervioso central como en el sistema respiratorio, por lo que se cuenta con un protocolo para llevar a cabo un estudio clínico para comparar la administración de DEX por vía intranasal *versus* intravenosa en pacientes con formas moderadas y severas de COVID-19 (Cárdenas et al., 2022).

Derivado de estos resultados se ha considerado que esta nueva vía de administración podría ser una alternativa para su uso en la clínica, lo que requiere de estudios de biodisponibilidad y farmacocinética clínica que permita conocer las concentraciones plasmáticas al utilizar esta vía.

2. ANTECEDENTES

2.1 Neuroinflamación

Se define a la neuroinflamación como una respuesta inflamatoria dentro del cerebro o la médula espinal, la cual puede ser causada por varias situaciones patológicas como infecciones, trauma, isquemia y toxinas. Los elementos clave de la respuesta inflamatoria en el sistema nervioso central responden a un patrón claramente definido. Existen diferentes mediadores de la inflamación entre los que se encuentran la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-18, el factor de necrosis tumoral (NTF), las quimioquinas como el ligando de quimioquina 1 (CCL1, CCL5) y el ligando de quimioquina 1 (CXCL1), mensajeros moleculares como las prostaglandinas, las células inmunes innatas de la microglía y los astrocitos, principalmente. También las células endoteliales capilares y las células sanguíneas infiltrantes contribuyen en la neuroinflamación, especialmente cuando existen daños bioquímicos o mecánicos en la barrera hematoencefálica. La liberación de moléculas proinflamatorias puede generar disfunción sináptica, muerte neuronal e inhibición de la neurogénesis (DiSabato et al., 2016; Heneka et al., 2014; Leng & Edison, 2021).

La neuroinflamación es una característica común en distintas enfermedades neurológicas y en muchas de estas patologías están claramente asociada con la patogénesis. Sin embargo, la mayoría de las veces la neuroinflamación se trata cuando esta ya es una respuesta exacerbada (Kwon & Koh, 2020).

Los principales fármacos aprobados para el tratamiento de la neuroinflamación incluyen a los glucocorticoides, entre ellos, la dexametasona, prednisolona, metilprednisolona-e hidrocortisona (Mehta et al., 2022).

2.2 Glucocorticoides

Los glucocorticoides son hormonas suprarrenales endógenas y existen varios derivados sintéticos de estos, los cuales son frecuentemente usados para el tratamiento de enfermedades inflamatorias. La mayoría de las actividades fisiológicas y celulares de los glucocorticoides son mediadas por el receptor de glucocorticoides, el cual es miembro de la superfamilia de receptores nucleares de factores de transcripción activados por ligando (Oakley & Cidlowski, 2013). Los glucocorticoides

modulan la diferenciación, supervivencia y función de los leucocitos. Debido a su rol fundamental, la administración de glucocorticoides puede afectar de forma positiva en la susceptibilidad y progresión de enfermedades inflamatorias (Schweingruber et al., 2012). Los glucocorticoides son la primera clase de mediadores antiinflamatorios endógenos que se han utilizado con éxito con fines terapéuticos; budesonida y beclometasona son ampliamente utilizados para el tratamiento del asma, la prednisolona se usa para la artritis reumatoide y otras enfermedades autoinmunes, en tanto la mometasona y la hidrocortisona se usan para el eczema y la psoriasis (Safavynia & Goldstein, 2019).

Estos medicamentos se encuentran en presentación oral o intravenosa, por lo cual alcanzan una baja concentración a nivel cerebral, por lo que se emplean dosis altas para alcanzar niveles terapéuticos, generando efectos secundarios (Schweingruber et al., 2012). Uno de los glucocorticoides más extensamente usados es la dexametasona (R. Yang & Yu, 2021).

2.3 Dexametasona

La dexametasona es un corticosteroide adrenal sintético, con potentes propiedades antiinflamatorias e inmunosupresoras y baja actividad mineralocorticoide. Además de unirse a receptores de esteroides nucleares específicos, la DEX, inhibe la activación del factor nuclear-kB (NF-kB) y las vías apoptóticas (National Cancer Institute, 2022).

2.3.1 Propiedades fisicoquímicas

En la figura 1 se presenta la estructura molecular de la dexametasona y en la tabla 1 se resumen sus propiedades fisicoquímicas.

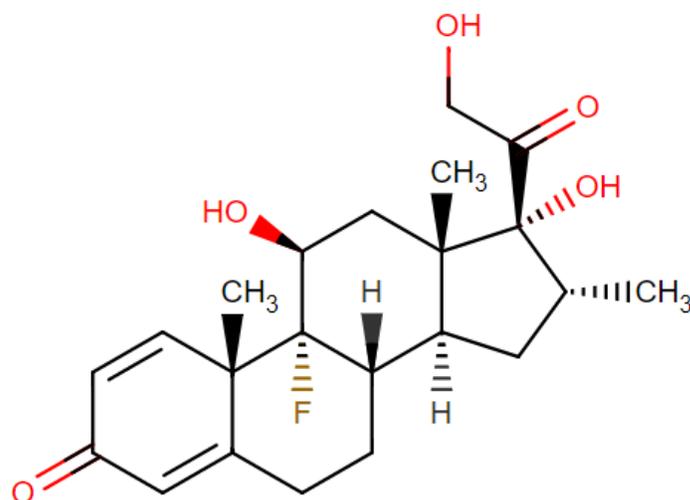


Figura 1. Estructura de la dexametasona (DrugBank, 2022)

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de la Dexametasona (DrugBank, 2022).

Propiedad	Valor
Peso molecular	392.5 g/mol
Descripción física	Polvo cristalino inodoro de color blanco
Solubilidad en agua (25 °C)	0.05 – 1 mg/mL
Solubilidad	Acetona, etanol, cloroformo
Log P	1.68 – 1.93
Log S	-3.64 – -3.9
Punto de fusión	260 – 264 °C
pKa	-3.3 y 12.42

2.3.2 Mecanismo de acción

La unión de los corticosteroides al receptor de glucocorticoides regula cambios en la expresión génica que producen múltiples efectos, entre los cuales se encuentran la inhibición de la apoptosis, desmarginación de los neutrófilos, promoviendo la liberación de los neutrófilos medulares y prolongando la vida media de los circulantes, inhibición de la fosfolipasa A2, disminuyendo la formación de derivados del ácido araquidónico; inhibición del factor nuclear-kB y otros factores de transcripción inflamatorios y la promoción de genes antiinflamatorios como la interleucina-10. A bajas dosis los corticosteroides proveen de un efecto antiinflamatorio, mientras que a dosis altas son inmunosupresores (Ramamoorthy & Cidlowski, 2016; Swartz & Dluhy, 1978).

2.3.3 Farmacocinética

La DEX se absorbe rápidamente después de una administración oral, sin embargo, su biodisponibilidad es menor por esta vía que por la vía intramuscular y ésta es menor que la vía intravenosa. Las concentraciones plasmáticas máximas se obtienen entre 1.6 a 2.0 h después de la administración, independientemente de la vía de administración, con excepción de la intravenosa (Loew, 1986). La biodisponibilidad oral es de un 70 a 78% en voluntarios sanos (Spoorenberg, 2014). Una vez en que alcanza la circulación sistémica, la dexametasona tiene una unión a proteínas del 77%. Se ha demostrado que el metabolismo de dexametasona se lleva a cabo en microsomas hepáticos formando productos hidroxilados y de cadena lateral escindida. Los productos de cadena lateral escindida son la 9 α -fluoro-androsta-1,4-diona-11 β -hidroxi-16 α -metil-3,17-diona (9 α -F-A) y la 6-hidroxi-9 α -fluoro-androsta-1,4-diona-11 β -hidroxi-16 α -metil-3,17-diona (6-OH, 9 α -F-A); Existen 2 principales productos de 6 hidroxilación (α y β), siendo el 6 β -hidroximetasona el metabolito mayoritario. Se ha demostrado que la formación de estos metabolitos (figura 2) está correlacionada con los niveles de CYP3A4 y que la formación de cada metabolito está altamente correlacionada con el otro. Los valores de K_m son similares pero presentan diferentes valores de V_{max} , por lo que es posible que ambos epímeros sean productos de un intermediario enzima-sustrato común (Gentile et al., 2015).

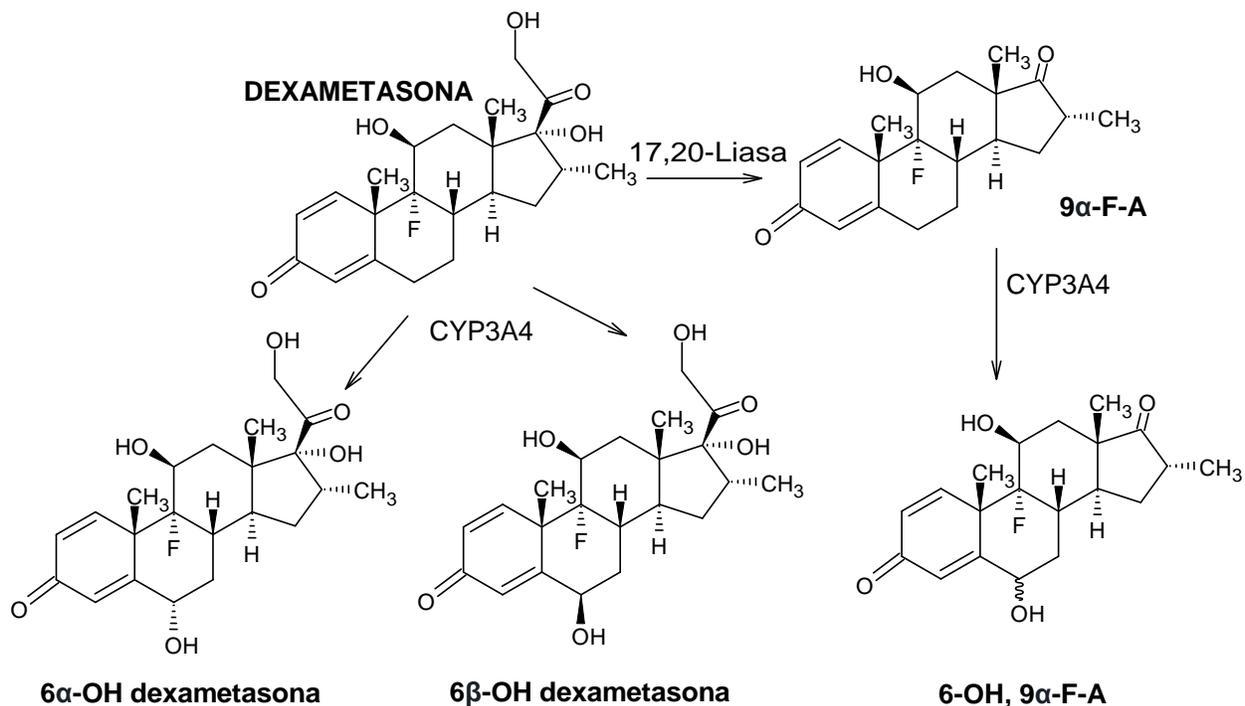


Figura 2. Metabolismo de dexametasona (Gentile et al., 2015).

Para la vía intravenosa la concentración interpolada a tiempo 0 h después de la administración de una dosis de 4 mg, fue de aproximadamente 95 ng/mL y para una dosis de 20 mg por la vía oral el valor de C_{max} fue de 245 ng/mL (Food and Drug Administration (FDA), 2019; Spoorenberg et al., 2014).

Los corticosteroides se eliminan predominantemente por la vía hepática siendo el aclaramiento renal menor al 10%. La vida media de eliminación es de aproximadamente 4h (Tabla 2) y se considera que la eliminación es rápida, ya que la concentración después de 24 h es menor la décima parte del C_{max} (Czock et al., 2005; Food and Drug Administration, 2019).

Tabla 2. Parámetros farmacocinéticos de dexametasona vía oral, intravenosa e intramuscular (Loew et al., 1986; Spoorenberg et al., 2014)

	(Spoorenberg et al., 2014)		(Loew et al., 1986)			
	6 mg oral (n=15)	4 mg IV (n=15)	0.5 mg oral (n=10)	0.75 mg oral (n=3)	1.5 mg oral (n=10)	3.0 mg intramuscular (n=10)
AUC (0, t) ($\mu\text{g}^*\text{h/L}$)	-	-	58 ± 11	69 ± 11	113 ± 38	331 ± 50
AUC (0, ∞) ($\mu\text{g}^*\text{h/L}$)	774	626	-	-	-	-
$t_{1/2}$ (h)	6.9	9	5.2 ± 3.0	4.8 ± 3.9	6.6 ± 4.3	4.2 ± 1.2
Volumen de distribución (L/kg)	1.09	0.94	-	-	-	-
Tiempo de residencia medio (h)	12.4	10.3	7 ± 2.3	7.2 ± 3.8	9.1 ± 4.0	7.1 ± 1.4
Aclaramiento (L/h)	7.7	6.4	10 ± 2.3	12.3 ± 3.5	15.6 ± 4.9	9.9 ± 1.4

Nota: En el artículo de Spoorenberg et a., Todos los datos se enumeran como mediana con rango intercuartílico.

2.4 Presentaciones farmacéuticas en el mercado y usos terapéuticos aprobados

En la tabla 3 se presentan las diversas formas farmacéuticas disponibles y los usos terapéuticos aprobados para la DEX. En ella se puede observar que este corticosteroide es utilizado en una gran variedad de enfermedades, por sus efectos antiinflamatorios e inmunosupresores. Aunado a lo anterior, se encuentra también en diferentes presentaciones farmacéuticas para su uso por vía enteral o parenteral. En el caso de la presentación oftálmica se encuentra indicada para aquellos casos donde el proceso inflamatorio ocular es severo (D.R.Consejo de Salubridad General. Comisión, 2017).

En el caso de cuadros de neuroinflamación, la dosis inicial recomendada por vía intravenosa es de 8 mg, seguido de 4 mg vía intramuscular cada 6 horas hasta la remisión de los síntomas de edema. En el caso de la neurocisticercosis subaracnoidea con inflamación, la dosis es de 8 mg cada 8 horas hasta la disminución de la inflamación, mientras que, en neurocisticercosis quística gigante, la dosis recomendada de dexametasona es de 0.5 mg/kg/día dividido en tres dosis durante al menos 14 días (Nash et al., 2011).

Tabla 3. Presentaciones farmacéuticas y usos terapéuticos (D.R.Consejo de Salubridad General. Comisión, 2017).

Forma farmacéutica	Indicaciones	Vía de administración y Dosis
Tableta, cada tableta tiene 0.5 mg de DEX.	Enfermedades alérgicas, inflamatorias, enfermedad de Addison y asma bronquial.	Oral. Adultos inicial: 0.25 a 4 mg/día, cada 8 h. Mantenimiento: 0.5 a 1.5 mg/día, cada 8 h. Niños: 0.2 a 0.3 mg/kg de peso corporal/día, cada 8 h.
Sol. inyectable, cada frasco o ampula contiene: Fosfato sódico de dexametasona equivalente a 8 mg de fosfato de DEX.	Anemia y trombocitopenia autoinmunes, leucemia, linfoma, síndrome de coagulación intravascular, edema cerebral.	Intravenosa/Intramuscular. Adultos: 4 a 20 mg/día en dosis mayores fraccionar cada 6 a 8 h. Dosis máxima: 80 mg/día.
Sol. Oftálmica, cada 100 mL contiene 0.1 g de fosfato de DEX.	Uveítis, iridociclitis, fenómenos inflamatorios en párpados y conjuntivas.	Oftálmica. Una a dos gotas, 4-6 veces al día.
Implante intraocular (intravítrea), cada implante contiene 700 µg de DEX.	Uveítis no infecciosa que afecta el segmento posterior del ojo.	Oftálmica intravítrea. Adultos: 0.7 mg de dexametasona por ojo.
Solución inyectable, cada frasco o ampolleta contiene fosfato sódico de dexametasona equivalente a 8 mg de fosfato de DEX.	Procesos inflamatorios graves como: Artritis reumatoide, bursitis, espondilitis anquilosante, lupus eritematoso sistémico, osteoartritis, sinovitis.	Intravenosa, intramuscular, intraarticular o intralesional. Adultos: de 0.5 a 16 mg diarios por vía intramuscular o intravenosa.
Tableta, cada tableta tiene 0.5 mg de DEX.		Oral. Adultos: 0.25 a 4 mg/día cada 8 h, se disminuye dosis hasta alcanzar el efecto terapéutico. Dosis de sostén de 0.5 a 1.5 mg/día, cada 8 h. Niños: 0.2 a 0.3 mg/kg de peso corporal al día, cada 8 h.

2.5 Uso de la DEX para COVID-19

En diciembre del 2019, una nueva enfermedad similar a la neumonía surgió en Wuhan China. Algunos de los síntomas que los pacientes infectados con el nuevo coronavirus (SARS-CoV-2) mostraron fue tos seca, fiebre y disnea con afectación del tracto

respiratorio inferior. La pandemia de COVID-19 se considera la crisis de salud pública más grave desde el brote de influenza en 1918 (Pal et al., 2020). El tiempo de incubación del virus va de 3-7 días, pero puede ser de hasta 14 en algunos casos. Los principales hallazgos de laboratorio incluyen un incremento de glóbulos blancos con linfopenia, proteína C reactiva elevada, ferritina y dímeros-D elevados, posteriormente una respuesta inmunitaria desregulada conduce a una liberación exacerbada de citocinas (como IL-1, IL-6 y NTF- α) y una lesión pulmonar mediada por el sistema inmune, como factor patogénico crítico en la progresión de la enfermedad o síndrome de dificultad respiratoria del adulto (Pedersen & Ho, 2020). Por su alta potencia antiinflamatoria, la dexametasona fue considerada para ser utilizada en estudios clínicos para evaluar su eficacia para el tratamiento del COVID-19 (Ahmed & Hassan, 2020). Actualmente, se considera el estándar de tratamiento farmacológico en pacientes hospitalizados por infección confirmada por SARS-CoV-2 o con sospecha clínica de COVID-19, que requieran de oxigenación suplementaria o estén en ventilación mecánica (Ahmed & Hassan, 2020). Para el tratamiento de COVID-19, la dosis en adultos es de 6 mg una vez al día hasta 10 días, de acuerdo con los signos clínicos del paciente.

2.6 Administración de DEX por vía nasal

Los glucocorticoides son poderosos medicamentos inmunosupresores y antiinflamatorios. Sin embargo, la mayoría de los glucocorticoides disponibles en el mercado vienen en presentación oral o intravenosa, por lo que tienen una baja eficiencia de focalización cerebral (Oray et al., 2016). Una alternativa novedosa para abordar este desafío, es la administración intranasal (IN), ya que esta ruta puede transportar glucocorticoides (GC) directamente al sistema nervioso central a través del nervio oftálmico y trigémino pasando por alto la barrera hematoencefálica (Ahmed & Hassan, 2020).

Estudios previos han demostrado la eficacia de la DEX por vía intranasal en modelos animales, por lo que es necesario realizar estudios de biodisponibilidad y farmacocinética clínica en humanos al utilizar esta nueva vía de administración (Cárdenas et al., 2022). Para llevar a cabo estos estudios, se requiere contar con un

método analítico que sea sensible, selectivo y reproducible, para la cuantificación de DEX en plasma. Se han reportado algunos métodos de cuantificación, empleando tanto detector de UV como detector de masas, los cuales se resumen en la tabla 4.

Tabla 4. Métodos analíticos cromatográficos reportados para la cuantificación de dexametasona (Chen et al., 2002; Harahap et al., 2009; Hempen et al., 2012; Razzaq et al., 2017; Song et al., 2004; Y. Yang et al., 2008).

Métodos analíticos (Autores)	Muestra y cantidad	Columna	Fase móvil y Flujo	Rango de la curva	Método de extracción	Detector
(Song et al., 2004).	Plasma humano -1.5 mL	C-18	Acetonitrilo (ACN) – 10 mM fosfato de sodio dibásico (32:72, v/v, pH 7.0) – 1 mL/min	10 - 200 ng/mL	Extracción líquido – líquido (acetato de etilo)	UV
(Harahap et al., 2009).	Plasma de humano -1 mL	C-18	Solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 7.0: Acetonitrilo (71:29, v/v) – 1.5 mL/min	1-100 ng/mL	Extracción líquido-líquido (dietil eter: diclorometano (6:4)	UV
(Razzaq et al., 2017).	Suero humano - 250 µL	C-8	Solución amortiguadora de fosfatos 0.02 M pH 3 y metanol 42:58 v/v – 1.5 mL/min	5.1 - 35.7 ng/mL	Precipitación de proteínas (Solución amortiguadora de fosfatos:metanol 42:58)	UV
(Chen et al., 2002)	Plasma humano - 500 µL	C-18	ACN: 0.1% ácido fórmico en agua (35: 65 v/v) - 0.5 mL	0.250 - 250 ng/mL	Extracción líquido - líquido (Metil terbutil éter (MTB)).	Masas
(Hempen et al., 2012)	Plasma humano - 1 mL	C-18	Metanol (MeOH): ácido fórmico 0.1 % (Gradiente de flujo)	1.18 – 23.5 ng/mL	Precipitación proteínas (ACN) y extracción en fase solida (Cartucho C18)	Masas
(Y. Yang et al., 2008)	Plasma humano - 200 µL	C-8	Amoniaco 0.5% pH 8.5: ACN (gradiente de flujo) a 1.5 mL	5-500 ng/mL	Precipitación (100 µL de MeOH +1 mL isopropanol) y extracción líquido-líquido (éter:diclorometano 60:40)	Masas

2.7 Validación de métodos

Los estudios de farmacocinética, biodisponibilidad y monitoreo terapéutico requieren que los métodos estén validados. La validación es la evidencia documentada de que un sistema o proceso cumple con los criterios establecidos, replicando así resultados consistentes y asegurando así el objetivo con el que fue desarrollado. Existen varias guías que establecen los criterios y requisitos para la validación de métodos analíticos a ser utilizados en estudios de biodisponibilidad o farmacocinética. En México los criterios están descritos en el apartado 9 de la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, mientras que la FDA de Estados Unidos de Norteamérica y la unión Europea EMA cuentan con guías específicas para la validación de métodos analíticos en fluidos biológicos. En la tabla 5 se presentan los criterios de aceptación de las guías antes mencionadas.

Tabla 5. Comparación de los criterios para la validación entre NOM-177 y las guías de la FDA y EMA.

Parámetro	NOM 177-SSA1-2013	FDA	EMA
Selectividad Demostrar la no interferencia de compuestos endógenos de la matriz biológica.	Se evalúan 6 unidades distintas. La respuesta analítica debe ser menor al 20% para el límite inferior de cuantificación del analito (LIC) y del 5% para el estándar interno (EI).		
Especificidad Demostrar la no interferencia de moléculas de reacción cruzada, medicamentos concomitantes, especies biotransformadas.	N/A	La respuesta analítica debe ser menor al 20% para el límite inferior de cuantificación del analito y del 5% para el EI.	N/A
Acarreo Demostrar la no interferencia de inyecciones anteriores en las muestras.	Se evalúan 3 inyecciones de una misma muestra blanco, siendo una antes y dos después de una inyección del límite superior de cuantificación (LSC). La respuesta debe ser menor al 20% del LIC para el analito y del 5% para el EI.	Asegurar que no haya acarreo, en caso de haber no debe exceder el 20% del LIC.	Asegurar que no haya acarreo, en caso de haber no debe exceder el 20% del LIC, y del 5% para el EI.

N/A=No aplica

Tabla 5. Comparación de los criterios para la validación entre NOM-177 y las guías de la FDA y EMA, continuación.

Parámetro	NOM 177-SSA1-2013	FDA	EMA
<p>Límite Inferior de Cuantificación (Sensibilidad) Es el punto más bajo de la curva de calibración.</p>	<p>Se determina con el 5% del C_{max} reportado.</p>	<p>Debe ser al menos 5 veces la respuesta de un blanco. Por quintuplicado. La exactitud y precisión (CV%) no debe exceder $\pm 20\%$.</p>	<p>Debe ser al menos 5 veces la respuesta de un blanco y debe adaptarse a los objetivos del estudio. Ej. 5% del C_{max} reportado.</p>
<p>Curva de calibración</p>	<p>Debe estar compuesta por un blanco, muestra cero y al menos 6 concentraciones. La relación concentración-respuesta debe ajustarse al modelo matemático más sencillo. La concentración recuperada de la curva de calibración debe estar dentro del 15% de la concentración nominal en cada nivel de concentración, excepto para el límite inferior de cuantificación, ya que puede ser menor o igual que el 20%. Al menos el 75% de las concentraciones de la curva de calibración con un mínimo de 6 puntos deben cumplir con este criterio.</p> <p>Para la NOM-177 y EMA, se evalúan al menos 3 curvas de calibración y del total de las curvas evaluadas, al menos el 50% de cada nivel de concentración debe cumplir con el criterio del 15% de la concentración nominal y 20% para el límite inferior de cuantificación. Para la FDA se corre una curva cada corrida analítica.</p>		
<p>Estabilidad Para evaluar en automuestreador, corto plazo, ciclos de congelación/descongelación, estabilidad a largo plazo.</p>	<p>Se evalúan por triplicado las concentraciones de la muestra control baja (MCB) y muestra control alta (MCA). La concentración promedio de cada nivel debe estar dentro del 15% de la concentración nominal.</p>		

Tabla 5. Comparación de los criterios para la validación entre NOM-177 y las guías de la FDA y EMA, continuación.

Parámetro	NOM 177-SSA1-2013	FDA	EMA
<p>Precisión (Repetibilidad)</p>	<p>Analizar en un mismo día por quintuplicado, límite inferior de cuantificación (LIC), muestra control baja (MCB), muestra control media (MCM) y muestra control alta (MCA). El CV% del valor promedio no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20%.</p>	<p>En al menos 3 corridas independientes, los 4 niveles por corrida (LIC, MCB, MCM y MCA) por quintuplicado. El CV% del valor promedio no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20%.</p>	<p>Intra: Al menos 5 muestra por nivel (LIC, MCB, MCM y MCA) en una sola corrida. El CV% del valor promedio no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20%.</p>
<p>Precisión (Reproducibilidad)</p>	<p>Analizar al menos por quintuplicado, en 3 corridas analíticas diferentes y al menos 2 días, las muestras control LIC, MCB, MCM y MCA. Puede cambiarse analista o equipo. El CV% del valor promedio no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20%.</p>	<p>En al menos 3 corridas independientes, los 4 niveles por corrida (LIC, MCB, MCM y MCA) por quintuplicado. El CV% del valor promedio no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20%.</p>	<p>Entre: Se evalúan LIC, MCB, MCM y MCA de al menos 3 corridas de 2 días distintos. El CV% del valor promedio no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20%.</p>

Tabla 5. Comparación de los criterios para la validación entre NOM-177 y las guías de la FDA y EMA, continuación.

Parámetro	NOM 177-SSA1-2013	FDA	EMA
Exactitud	De los datos de repetibilidad y reproducibilidad calcular la desviación de la concentración obtenida respecto al valor nominal (% de desviación). El valor promedio del % de desviación no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20%.	Intra y entre: En al menos 3 corridas independientes, los 4 niveles por corrida (LIC, MCB, MCM y MCA) por quintuplicado. El CV% del valor promedio no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20%.	Intra: En una corrida los 4 niveles (LIC, MCB, MCM y MCA) se evalúan por quintuplicado. El CV% del valor promedio no debe ser > 15%, excepto para el LIC, el cual debe ser ≤ 20%. Entre: LIC, MCB, MCM y MCA de al menos 3 corridas de 2 días distintos. El CV% del valor promedio no debe ser > el 15%, excepto para el LIC el cual debe ser ≤ 20%.
Estabilidad en solución	Con una dilución apropiada, se inyecta por triplicado una solución de referencia (stock) y la solución de trabajo, se comparan las almacenadas contra una solución recién preparada. Las soluciones serán consideradas estables si la desviación de la respuesta analítica promedio con respecto a la obtenida con muestras recién preparadas no es mayor que 10%.	Se evalúan bajo los criterios de estabilidad anteriores.	Con una dilución apropiada, se evalúan por triplicado la solución stock y la solución de trabajo con las concentraciones MCB y MCA. La concentración promedio de cada nivel debe estar dentro del 15% de la concentración nominal.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad la DEX sigue siendo uno de los fármacos de elección para el tratamiento de la neuroinflamación. En la mayoría de los casos, el tratamiento inicial es por vía intravenosa, que representa una vía de mayor riesgo. Además, se ha reportado que los corticosteroides presentan problemas para cruzar la barrera hematoencefálica, lo que contribuye a la variabilidad interindividual. Una alternativa novedosa para abordar estos desafíos es la administración intranasal (IN), ya que los fármacos liberados por esta vía llegan al cerebro a lo largo de las vías del nervio olfatorio y del trigémino, sorteando la barrera hematoencefálica, con buena biodisponibilidad, además de la facilidad de su administración. Estudios en animales han demostrado que la DEX por vía intranasal es más eficiente para controlar la neuroinflamación que la vía intravenosa, sin embargo, a la fecha no se han realizado estudios clínicos comparativos para evaluar la disposición de este fármaco al utilizar esta vía de administración.

Es por lo anterior que se requiere contar con un método analítico específico, preciso y exacto que pueda ser utilizado en estudios de farmacocinética y de monitoreo terapéutico de la DEX.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y validar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) acoplado a un detector UV para la cuantificación de dexametasona en plasma humano.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Seleccionar las mejores condiciones cromatográficas para la cuantificación de dexametasona en el rango de trabajo (20 – 200 ng/mL) en presencia de compuestos endógenos de la matriz, así como de los metabolitos.
- Seleccionar las condiciones de extracción que permitan obtener un recobro de dexametasona mayor al 70%.
- Validar el método desarrollado, tomando como guía la Normal Oficial Mexicana 177-SSA-2013.
- Aplicar el método analítico para la cuantificación de muestras provenientes de un estudio piloto de farmacocinética y el análisis de estos datos para confirmar su confiabilidad.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 REACTIVOS Y EQUIPOS

Reactivos

- Agua grado HPLC
- Metanol grado HPLC (J. T. Baker)
- Acetonitrilo grado HPLC (J. T. Baker)
- Hidróxido de potasio R. A. (J. T. Baker)
- Fosfato de sodio monobásico, monohidratado (J. T. Baker)
- Fosfato de sodio dibásico, anhidro R. A. (J. T. Baker)
- Diclorometano R. A. (J. T. Baker)
- Éter etílico R. A. (J. T. Baker)
- Sustancia de referencia, dexametasona (FEUM)
- Estándar secundario farmacéutico, metilprednisolona (Sigma-Aldrich)

Equipos

- Baño sonicador, Fisher Scientific FS160
- Campana de extracción
- Vortex Science MED MX-S
- Balanza analítica Sartorius, modelo: ENTRI6224I-15
- Parrilla de calentamiento y agitación Thomas Scientific
- Potenciómetro HANNA instruments, HI2211
- Espectrofotómetro UV-Vis Shimadzu UV-1900.
- Cromatógrafo de líquidos Shimadzu acoplado a un detector UV
- Centrifuga Hettich Universal 32 R
- Evaporador de muestras con nitrógeno
- Refrigerador Nieto REB-450

5.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Todos los volúmenes fueron tomados con pipetas automáticas calibradas.

Plasma humano

Las 6 unidades de plasma humano empleadas en la preparación de las muestras durante el desarrollo y validación del método fueron donadas por Medica Sur.

5.2.1 Soluciones

Agua: metanol (50: 50 v/v)

Se miden con exactitud empleando una pipeta volumétrica, 250 mL de agua y 250 mL de metanol, se vierten en un frasco de 500 mL y se homogenizan.

Hidróxido de potasio 2 M

Se pesan con exactitud 2.805 g de escamas de hidróxido de potasio, estas se añaden a un matraz de 100 mL con un poco de agua hasta homogenizar y se lleva al aforo.

Solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 7.0

Se pesan con exactitud 0.8460 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 0.5491 g de Na_2HPO_4 , se vierten en matraz volumétrico de 1 L y se le agregan 500 mL de agua, se disuelven y homogenizan para posteriormente llevar al aforo. Posteriormente, se mide y ajusta el pH a 7.0 con KOH 2 M y se filtra la solución.

Fase móvil, Solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 7.0: Acetonitrilo (60: 40 v/v)

Se miden 600 mL de buffer de fosfatos 10 mM pH 7.0 y 400 mL de acetonitrilo grado HPLC y se mezclan en un frasco de 1 L. Se homogenizan y se desgasifican por ultrasonido.

Solución de adecuabilidad del sistema

La solución para comprobar la adecuabilidad del sistema se prepara como se muestra en el diagrama 1. Esta solución tiene una concentración de dexametasona y metilprednisolona de 1 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente.

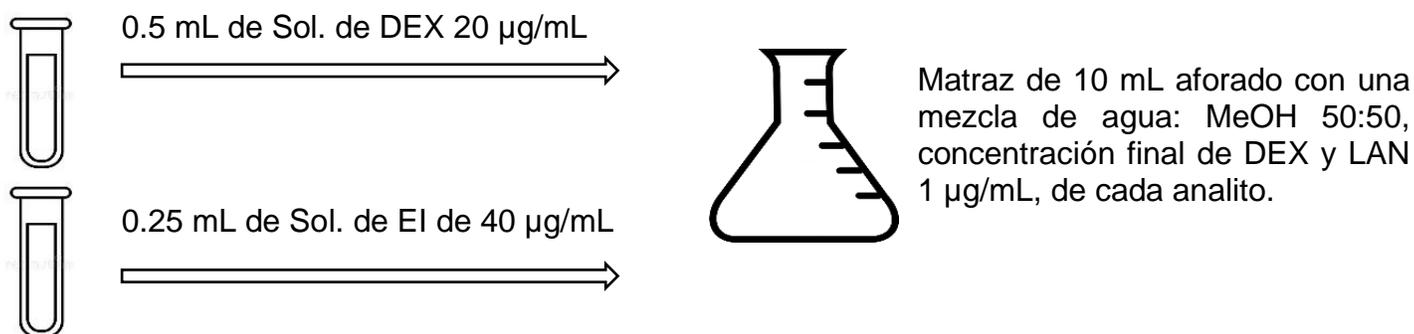


Figura 3. Diagrama de la preparación de solución para adecuabilidad

5.2.2 Soluciones Stock

Solución Stock de DEX 0.5 mg/mL

Se pesaron 10 mg de DEX con exactitud y se aforan a 20 mL con una mezcla agua: metanol 50: 50.

Solución Stock de metilprednisolona (MPS) 1 mg/mL

Se pesaron 10 mg de MPS con exactitud y se aforan a 10 mL con una mezcla agua: metanol 50: 50.

5.2.3 Soluciones estándar

5.2.3.1 Soluciones estándar de Dexametasona

A partir de la solución stock se prepararon las soluciones de trabajo de DEX de 4, 8, 12, 14, 16, 20, 25, 30, 35 y 40 $\mu\text{g/mL}$, como se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Preparación de soluciones de DEX para la curva de calibración.

Preparación de soluciones			
Conc Stock ($\mu\text{g/mL}$)	Alícuota (mL)	Volumen final (mL)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
500	0.08	10	4
500	0.16	10	8
500	0.24	10	12
500	0.28	10	14
500	0.32	10	16
500	0.4	10	20
500	0.5	10	25
500	0.6	10	30
500	0.7	10	35
500	0.8	10	40

Posteriormente, se realizó una dilución 1:10 en agua: metanol 1:1, para obtener soluciones de DEX de 0.4 a 4 $\mu\text{g/mL}$ y usarlas para la preparación de la curva de calibración y muestras control en plasma humano.

5.2.3.2 Soluciones estándar de metilprednisolona

Solución A. MPS 40 $\mu\text{g/mL}$

Se tomaron 0.4 mL de solución stock de MPS y se llevó a un matraz volumétrico de 10 mL. Se aforó con agua: metanol 50: 50.

Solución B. MPS 1 µg/mL

Se tomaron 250 µL de la solución A (40 µg/mL) y se llevó a un matraz volumétrico de 10 mL. Se aforó con agua: metanol 50: 50.

5.2.4 Curva de calibración

Curva de calibración en solución (Agua: MeOH)

Para la curva de calibración en solución y para determinar la respuesta cromatográfica se seleccionó, primeramente, el rango de 200 a 2000 ng/mL, considerando que la muestra de plasma se concentraría 10 veces. En la tabla 7 se presenta la preparación de la curva de calibración.

Tabla 7. Curva de calibración de DEX en solución.

Muestra	Concentración de DEX (µg/mL)	Alícuota (µL)	Volumen Solución (µL)	Volumen final (µL)	Concentración (µg/mL)	Concentración final (ng/mL)
C1	4	500	9500	10000	0.2	200
C2	8	500	9500	10000	0.4	400
C3	14	500	9500	10000	0.7	700
C4	16	500	9500	10000	0.8	800
C5	25	500	9500	10000	1.25	1250
C6	35	500	9500	10000	1.75	1750
C7	40	500	9500	10000	2	2000

Curva de calibración en plasma

La curva de calibración en plasma de dexametasona se preparó como se describe en la tabla 8. El volumen final fue de 1 mL.

Tabla 8. Curva de calibración de DEX en plasma

Muestra	Concentración de DEX (µg/mL)	Alícuota (µL)	Volumen plasma (µL)	Volumen final (µL)	Concentración en plasma (µg/mL)	Concentración final (ng/mL)
C1	0.4	50	950	1000	0.02	20
C2	0.8	50	950	1000	0.04	40
C3	1.4	50	950	1000	0.07	70
C4	1.6	50	950	1000	0.08	80
C5	2.5	50	950	1000	0.125	125
C6	3.5	50	950	1000	0.175	175
C7	4	50	950	1000	0.2	200

5.2.5 Muestras control

Selección y preparación de las muestras control en solución.

Las concentraciones seleccionadas para las muestras control fueron: muestra control alta (MCA): 1500 ng/mL, muestra control media (MCM): 1000 ng/mL y muestra control baja: (MCB) 600 ng/mL.

Las muestras control se prepararon conforme a lo descrito en la tabla 9; y el volumen final fue de 10 mL.

Tabla 9. Muestras control de DEX en solución

Muestra	Concentración de DEX ($\mu\text{g/mL}$)	Alícuota (μL)	Volumen Solución (μL)	Volumen final (μL)	Concentración (ng/mL)
MCB	120	50	9950	10000	600
MCM	200	50	9950	10000	1000
MCA	300	50	9950	10000	1500

Selección y preparación de las muestras control en plasma.

Las concentraciones seleccionadas para la preparación de las muestras control en plasma fueron: muestra control alta (MCA): 150 ng/mL, muestra control media (MCM): 100 ng/mL y muestra control baja: (MCB) 60 ng/mL.

Las muestras control se prepararon conforme a la tabla 10 y el volumen final fue de 1 mL.

Tabla 10. Muestras control de DEX en plasma

Muestra	Conc. de DEX (µg/mL)	Alícuota (µL)	Volumen plasma (µL)	Volumen final (µL)	Conc. en plasma (µg/mL)	Conc. final (ng/mL)
MCB	1.2	50	950	1000	0.06	60
MCM	2	50	950	1000	0.1	100
MCA	3	50	950	1000	0.15	150

5.3 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

Previo al desarrollo del método analítico se llevó a cabo una revisión bibliográfica de la literatura, la cual se describe en la tabla 4. Se decidió utilizar una columna C18, considerando que la mayoría de los artículos emplean esta columna. Las fases móviles evaluadas, se basaron también en esta revisión.

5.3.1 Detección de la longitud de onda de máxima absorción

El primer paso para llevar a cabo el desarrollo del método fue determinar la longitud de onda máxima de absorción (λ) de DEX debido a que el detector a utilizar era UV/Visible. Para ello se preparó una solución de DEX de una concentración de 10 µg/mL en agua: metanol 50: 50 y se realizó el barrido de 200 a 300 nm empleando un espectrofotómetro UV-Vis Shimadzu UV-1900.

5.3.2 Selección de la fase móvil y el estándar interno

La fase móvil en cromatografía de líquidos es importante para determinar la eficiencia de separación y la resolución de los componentes de la muestra. En el presente trabajo, las fases móviles evaluadas fueron las siguientes:

- Solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 7.0: metanol (70:30 v/v)
- Solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 7.0: acetonitrilo (70:30 v/v)
- Solución amortiguadora de fosfatos pH 3.0: acetonitrilo (70:30 v/v)
- Metanol: ácido acético 0.1% en agua (70:30 v/v)
- Acetonitrilo: ácido acético 0.1% en agua (70:30 v/v)

Para el estudio, se preparó una solución de dexametasona a una concentración de 10 µg/mL y se inyectó al cromatógrafo empleando las fases móvil a evaluar a una velocidad de flujo de 1.0 mL/min y una columna cromatográfica Zorbax Eclipse C-18 5µm, 4.6 x 250 mm.

En cada fase móvil se evaluó la simetría del pico, la intensidad de la respuesta cromatográfica y el tiempo de retención.

El uso de un estándar interno permite corregir posibles errores sistemáticos que ocurren en los análisis. Para el estándar interno (EI) se seleccionaron compuestos con estructuras o propiedades fisicoquímicas similares a la DEX. Los fármacos seleccionados fueron: betametasona, tramadol, cortisona, lansoprazol, loratadina, ondansetrón, hidrocortisona, omeprazol y metilprednisolona.

Para el estudio se prepararon soluciones en agua: metanol 50:50 (v/v) de cada uno de los estándares a una concentración de 2 µg/mL y se inyectaron por triplicado al cromatógrafo.

5.3.3 Selección del disolvente de extracción

Tras una revisión de la literatura de la solubilidad de dexametasona y metilpredisolona, se eligieron los siguientes disolventes de extracción: acetato de etilo, éter etílico, diclorometano, metil terbutil éter y mezclas de éter: diclorometano. Para la prueba se utilizaron las muestras control alta y baja, y se consideraron como porcentajes de recobro aceptables, aquellos que fueron superiores al 70%. El procedimiento utilizado se describe en diagrama 2.

Se evaluó el recobro de la extracción comparando la respuesta de la muestra de plasma extraída con la respuesta obtenida en solución. Dado que, con el éter etílico y el diclorometano, se presentaron menos señales de los compuestos endógenos del plasma, se evaluaron mezclas en las siguientes proporciones:

Éter: diclorometano (70: 30, 50:50 y 40:60 v/v).

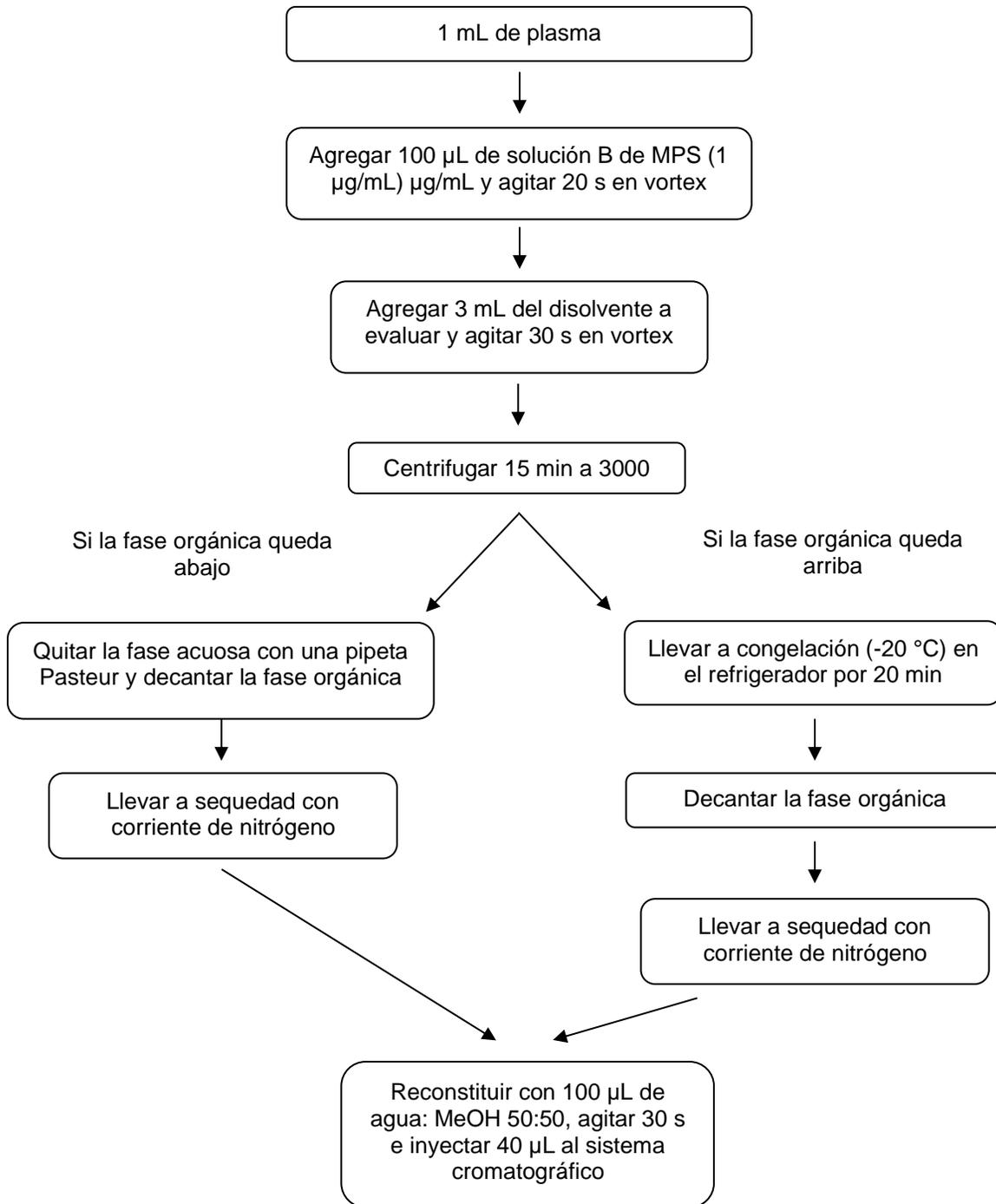


Figura 4. Diagrama del procedimiento de extracción

5.3.4 Condiciones de extracción

En una extracción líquido-líquido es importante optimizar las condiciones, para asegurar que la cantidad máxima de analito se transfiera de la matriz biológica a la fase orgánica, lo que conduce a una mayor sensibilidad en la cuantificación. Además,

puede minimizar la interferencia de los componentes endógenos lo que da como resultado una mejor precisión de los resultados. En el presente trabajo, las condiciones evaluadas fueron: tipo y tiempo de agitación, volúmenes del disolvente de extracción y la alcalinización de muestra. Las condiciones evaluadas se muestran en la tabla 11. Se siguió el procedimiento de extracción descrito en el diagrama 2 y los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, monitoreando el recobro de DEX y MPS y la simetría del pico.

Tabla 11. Factores evaluados para la extracción con la mezcla éter: diclorometano

Condición	Variable
Tiempo de agitación en vortex	Agitación vortex 1 min
	Agitación vortex 30 s
Tipo de agitación	Agitación vertical
	Agitación horizontal
Volumen de disolvente de extracción	3 mL
	5 mL
Alcalinizar	Sin alcalinizar
	+ 250 µL de NaOH 0.025M

5.4 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Los parámetros que se consideraron para la validación del método se basaron en lo establecido en la NOM-177-SSA1-2013 y fueron los siguientes: selectividad, acarreo, recobro, límite de cuantificación, linealidad, precisión, exactitud y estabilidad. Previo al análisis de las muestras se evaluó la adecuabilidad del sistema, inyectando 6 muestras de la solución de adecuabilidad. Si el CV% era menor a 2, se procedía con el análisis de las muestras.

5.4.1 Selectividad

Se prepararon 6 muestras blanco de plasma provenientes de 6 voluntarios diferentes y se analizaron empleando el método desarrollado.

Criterio de aceptación: La respuesta analítica de las interferencias próximas a los tiempos de retención debe ser menor al 20% para el límite inferior de cuantificación del analito y del 5% para el EI.

5.4.2 Acarreo

Se prepararon 3 muestras blanco y un LSC. Se inyectaron al sistema cromatográfico en el siguiente orden, una muestra blanco, el LSC y dos muestras blanco.

Criterio de aceptación: La respuesta analítica de las interferencias próximas a los tiempos de retención debe ser menor al 20% para el límite inferior de cuantificación del analito y del 5% para el EI.

5.4.3 Límite Inferior de cuantificación

El LIC se estableció como la menor concentración cuantificable por el sistema, con precisión y exactitud, el cual fue de 20 ng/mL. Para la evaluación, se preparó por triplicado la muestra con la concentración de 20 ng/mL y se analizó de acuerdo con el procedimiento previamente descrito.

Criterio de aceptación: El CV% debe ser $\leq 20\%$.

5.4.4 Linealidad

Para evaluar la linealidad se prepararon por triplicado, se prepararon curvas de calibración en plasma en el rango es de 20 a 200 ng/mL, en 2 días diferentes, con siete concentraciones distintas, sin incluir muestras blanco. Para cada curva se graficó el factor respuesta en función de la concentración de DEX. Se eligió el modelo matemático que mejor se ajuste. De cada curva se calculó la pendiente (m), ordenada al origen (b), coeficiente correlación (r) y coeficiente de determinación (r^2).

Criterio de aceptación: Los datos de concentración recuperada de la curva de calibración deben estar dentro del 15% de la concentración nominal en cada nivel de concentración, excepto para el límite inferior de cuantificación, ya que puede ser menor o igual que el 20%. Al menos el 75% de las concentraciones de la curva de calibración con un mínimo de 6 puntos deben cumplir con este criterio, $r \geq 0.99$ y $r^2 \geq 0.99$.

5.4.5 Precisión

La finalidad de la precisión es determinar si el método es capaz de producir resultados repetibles y confiables. Ésta se evaluó como repetibilidad y reproducibilidad.

5.4.5.1 Repetibilidad

En un mismo día se analizaron por quintuplicado las siguientes muestras control LIC (20 ng/mL), MCB (60 ng/mL), MCM (100 ng/mL), MCA (150 ng/mL). Se calculó la concentración obtenida de cada nivel interpolando el factor respuesta en la curva de calibración preparada el mismo día. Se calculó el promedio, la desviación estándar y el CV% para cada nivel.

Criterio de aceptación: El CV% del valor promedio no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20%.

5.4.5.2 Reproducibilidad

Se analizaron por quintuplicado en 2 días diferentes, las muestras control LIC, MCB, MCM y MCA. Se calculó la concentración recuperada interpolando la respuesta analítica en la curva de calibración. Se determinó el promedio, la desviación estándar y el CV% de cada nivel.

Criterio de aceptación: El CV% del valor promedio no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20%.

5.4.6 Exactitud

De los datos de repetibilidad y reproducibilidad se calculó el porcentaje de desviación de la concentración obtenida respecto al valor nominal (% de desviación) empleando la siguiente ecuación.

$$\% \text{ desviación} = 100 \times \frac{\text{Concentración adicionada} - \text{Concentración obtenida}}{\text{Concentración adicionada}}$$

El Criterio de aceptación: El valor promedio del % de desviación no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20%.

5.4.7 Estabilidad

Las condiciones de estabilidad que se evaluaron fueron: estabilidad de muestra procesada, estabilidad a corto plazo, ciclos de congelación-descongelación, estabilidad en automuestreador, estabilidad a largo plazo y estabilidad en solución. Todas las muestras de estabilidad fueron analizadas junto con una curva de calibración recién preparada, en la cual se interpolaron las respuestas obtenidas.

El criterio para considerar estables las muestras fue que la concentración obtenida de cada concentración debe estar dentro del 15 % de la concentración nominal. Para la estabilidad en solución, la desviación no debe ser mayor al 10 %.

5.4.7.1 Estabilidad de la muestra procesada

Se analizaron por triplicado las MCB y MCA, y se procesaron según el diagrama 2. Una vez procesadas se almacenaron en refrigeración 4°C. Pasado el tiempo de evaluación (24 h), se inyectaron al cromatógrafo y se calculó la concentración y el % de desviación con respecto a la concentración nominal

5.4.7.2 Estabilidad en automuestreador

Se prepararon por triplicado las MCB y MCA, las cuales se procesaron según el diagrama 2, se colocaron en el automuestreador y se mantuvieron durante 49 h, pasado este tiempo, se analizaron y se calculó la concentración recuperada y el % de desviación con respecto a la concentración nominal.

5.4.7.3 Estabilidad a corto plazo

Se prepararon por triplicado las MCB y MCA, las cuales se procesaron según el diagrama 2 hasta el paso antes de la extracción, se guardan las muestras bajo refrigeración (4°C) y a temperatura ambiente (25 °C). Después de 24 h se analizaron y se calculó la concentración y el % de desviación con respecto a la concentración nominal

5.4.7.4 Estabilidad a largo plazo

Se prepararon por triplicado las MCB y MCA en plasma, las cuales se almacenaron en condiciones de congelación (-2 °C). Después de 49 días se descongelaron, se

procesaron, se calculó la concentración y el % de desviación con respecto a la concentración nominal.

5.4.7.5 Estabilidad ciclos de congelación-descongelación

Se prepararon por triplicado las MCB y MCA en plasma y se almacenaron en condiciones de congelación durante 24 h. Una vez congeladas se descongelaron a temperatura ambiente, que representa un ciclo de congelación-descongelación, se congelaron nuevamente y descongelaron hasta tener 3 ciclos de congelación-descongelación y posteriormente se procesaron y se calculó la concentración recuperada. La concentración promedio de cada nivel debe estar dentro del 15% de la concentración nominal.

5.4.7.6 Estabilidad de las soluciones Stock

Se evaluó la estabilidad de soluciones stock de DEX y MPS, las cuales se guardaron en refrigeración durante 120 y 36 días respectivamente. A partir de esas soluciones se preparó la muestra de DEX 20 µg/mL y de MPS de 40 µg/mL las cuales se inyectaron por triplicado juntamente con una muestra hecha de soluciones preparadas el mismo día de análisis. Se calculó el % de desviación con respecto a la muestra de solución recién preparada.

5.5 ANÁLISIS DE MUESTRAS DE VOLUNTARIOS

Con el fin de determinar la confiabilidad del método desarrollado, se analizaron muestras de dos voluntarios sanos, provenientes de un estudio piloto de biodisponibilidad correspondientes, a los cuales se les administró un volumen de 1.5 mL de solución de DEX, Alín ® por vía intravenosa y por vía intranasal equivalente a 6 mg de dexametasona en condiciones de ayuno. Las muestras sanguíneas se tomaron a los tiempos 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 8.00, 12.00 y 24.00 horas, se entregaron congeladas y se almacenaron a - 2 °C hasta su análisis.

Al momento del análisis de las muestras, éstas se descongelaron a temperatura ambiente y se homogenizaron con vórtex. Las muestras se analizaron empleando el método previamente validado también se analizaron los 3 niveles de muestras control (MCB, MCM y MCA), las cuales fueron distribuidas de manera homogénea a lo largo

de la corrida analítica. Las respuestas se interpolaron en una curva de calibración preparada el mismo día del análisis.

Los datos de concentración plasmática vs tiempo obtenidos por ambas vías se ajustaron a un modelo compartimental y no compartimental.

Los parámetros calculados que emplearon el modelo no compartimental fueron: concentración plasmática máxima (C_{max}), tiempo en el que se alcanza la concentración máxima (t_{max}), área bajo la curva de 0 a tiempo final y de 0 a infinito (AUC_{0-t} y $AUC_{0-\infty}$), vida media de eliminación ($t_{1/2}$), tiempo medio de residencia (TMR) y constante de eliminación (K_e).

5.6 ANÁLISIS DE DATOS – PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS

La comparación de los resultados obtenidos con el método validado y otros previamente reportados ayuda a mejorar la confianza en los resultados y a reafirmar la validez de la técnica, al presentar datos que son verificables y reproducibles con otros investigadores o analistas.

Los datos obtenidos se ajustaron a un modelo compartimental y no compartimental.

Los parámetros calculados que emplearon el modelo no compartimental fueron: concentración plasmática máxima (C_{max}), tiempo en el que se alcanza la concentración máxima (t_{max}), área bajo la curva de 0 a tiempo final y de 0 a infinito (AUC_{0-t} y $AUC_{0-\infty}$), vida media de eliminación ($t_{1/2}$), tiempo medio de residencia (TMR) y constante de eliminación (K_e).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Desarrollo del método analítico

6.1.1 Determinación de la longitud de onda máxima de absorción

En la figura 3 se presenta el espectro de absorción al UV una solución de DEX de 10 $\mu\text{g/mL}$, en la que se puede observar un máximo de absorción a 242 nm, el cual corresponde con lo reportado en la literatura (Al-Owaidi et al., 2021).

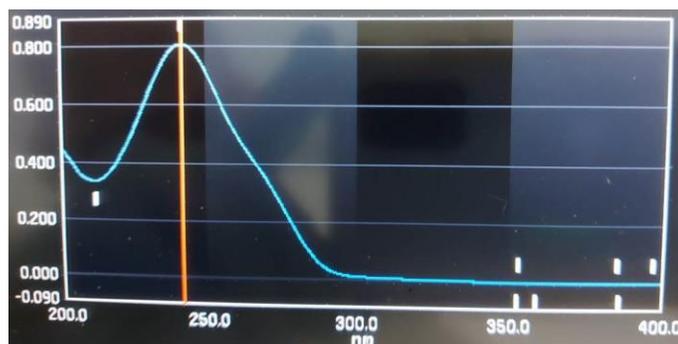


Figura 5. Máximo de absorción de DEX empleando un espectrómetro UV

6.1.2 Selección de la fase móvil y el estándar interno.

A continuación se presentan los cromatogramas obtenidos en las distintas fases móviles evaluadas. Se puede observar que en la fase móvil acetonitrilo: ácido acético 0.1% en agua (70:30 v/v) se presentó un pico hombreado, sin simetría y un tiempo de retención muy corto.

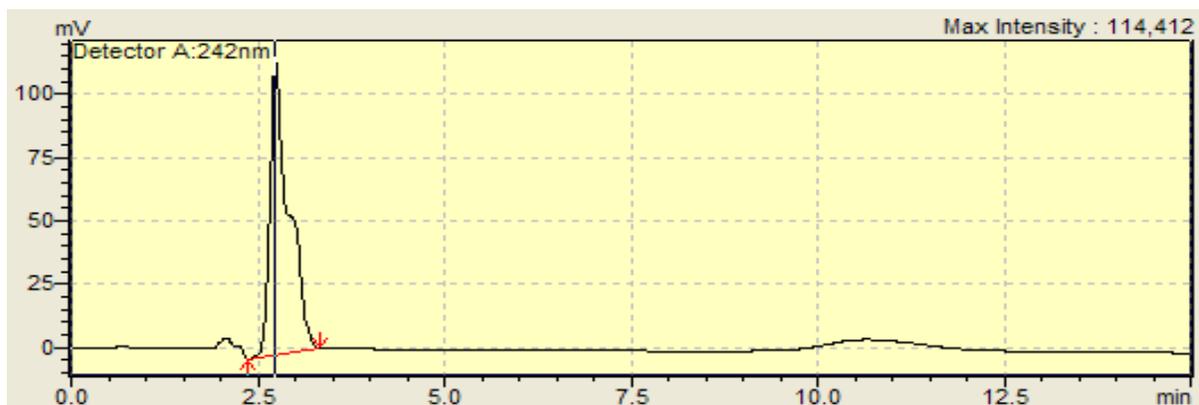


Figura 6. Cromatograma de DEX en la fase móvil acetonitrilo: ácido acético 0.1% en agua (70:30 v/v)

En la fase móvil metanol: ácido acético 0.1% en agua (70:30 v/v) se obtuvo un pico simétrico, pero la señal obtenida fue baja y la línea base no se mantiene estable (figura 5).

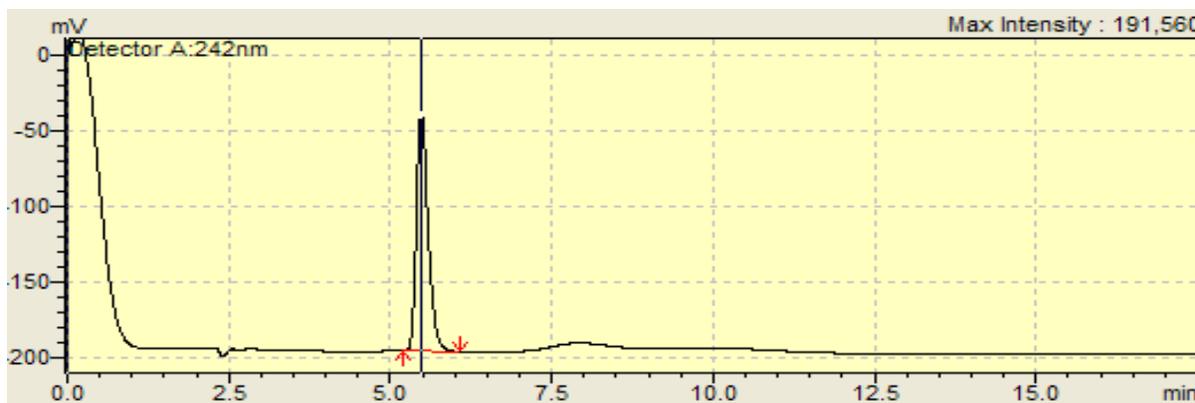


Figura 7. Cromatograma de DEX en la fase móvil metanol: ácido acético 0.1% en agua (70:30 v/v)

Al utilizar las fases móviles de solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 3.0: acetonitrilo (70:30 v/v) (figura 6) y solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 7.0: acetonitrilo (70:30 v/v) (figura 7), se obtuvieron picos simétricos con tiempos de retención 15.5 y 13.6 min, respectivamente, pero la corrida se considera muy larga.

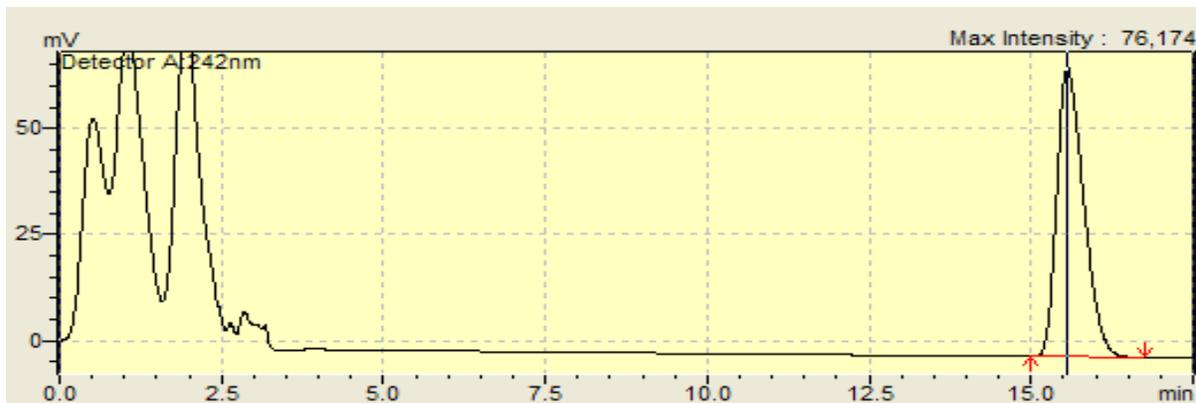


Figura 8. Cromatograma de DEX en la fase móvil solución amortiguadora de fosfatos pH 3.0: Acetonitrilo (70:30 v/v)

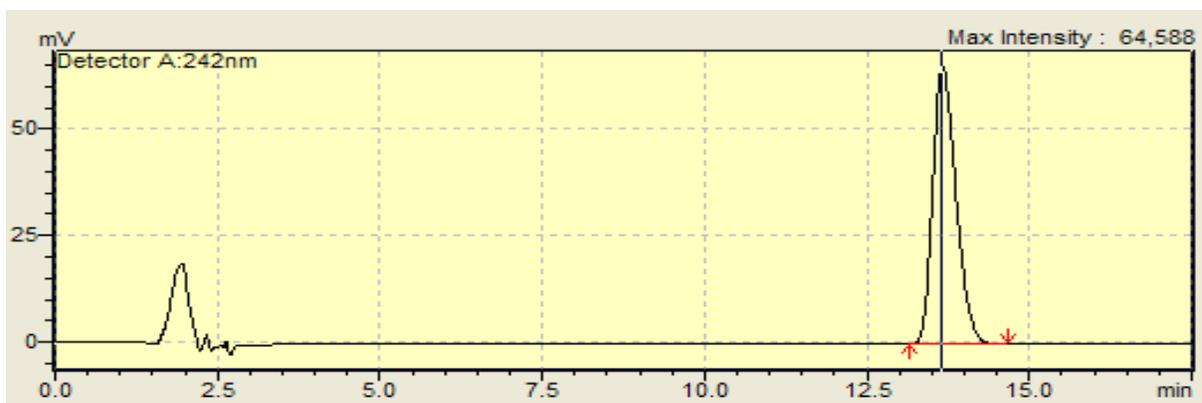


Figura 9. Cromatograma de DEX en la fase móvil solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 7.0: Acetonitrilo (70:30 v/v)

Al modificar la proporción de solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 7.0: acetonitrilo a (60:40 v/v) se redujo el tiempo de retención y se tiene una buena simetría del pico, por lo que se eligió para ser utilizada para el análisis (figura 8).

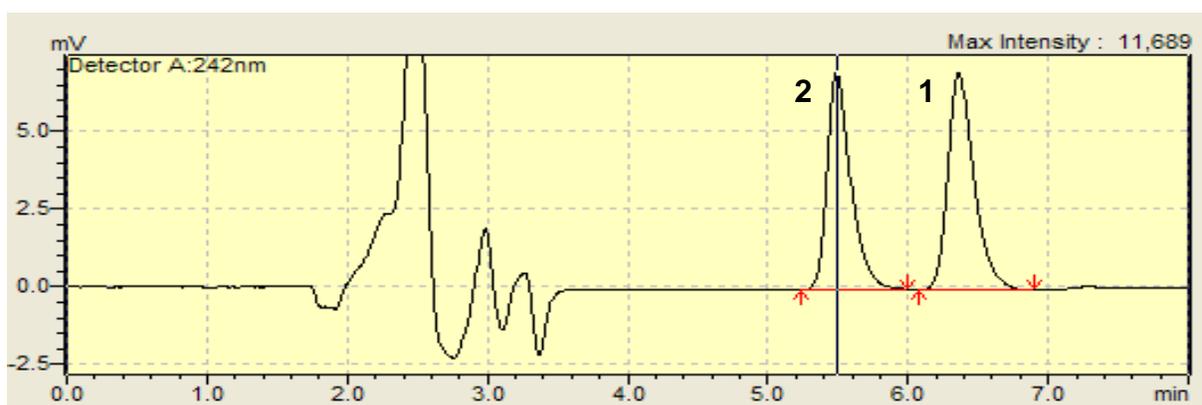


Figura 10. Cromatograma de DEX (1) y EI (2) en la fase móvil solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 7.0: acetonitrilo (60:40 v/v)

6.1.3 Selección del estándar interno.

La betametasona, el tramadol, la loratadina y la hidrocortisona no presentaron respuesta cromatográfica en las condiciones cromatográficas utilizadas. En las figuras 12 – 16 se presentan los cromatogramas obtenidos con ondansetrón, cortisona, lansoprazol, omeprazol y metilprednisolona, respectivamente. Para el caso de ondansetrón el tiempo de retención fue demasiado cercano al pico de dexametasona, en el caso de la cortisona el tiempo de retención fue muy largo y el tiempo de retención de la metilprednisolona (MPS) fue cercano al de la DEX, se logró la correcta

separación de picos y se obtuvieron los resultados más reproducibles, lo cual se debe a que las estructuras químicas de DEX y del MPS (figura 11) y las propiedades fisicoquímicas de ambos compuestos (tabla 12), son semejantes.

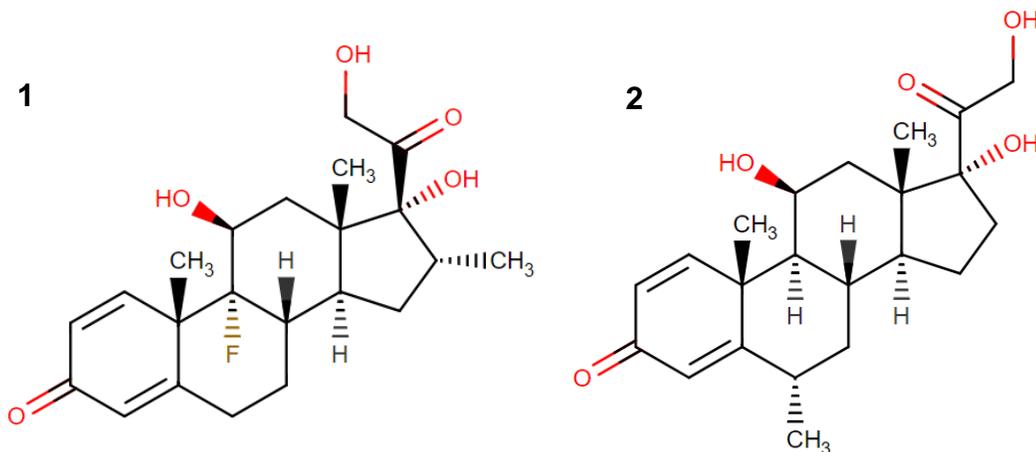


Figura 11. Comparación de la estructura química de DEX (1) y EI (2) (DrugBank, 2022).

Tabla 12. Comparación de propiedades fisicoquímicas de DEX y el EI (DrugBank, 2022).

Propiedad	Valor	
Compuesto	Dexametasona	Metilprednisolona
Peso molecular	392.5 g/mol	374.5 g/mol
Descripción física	Polvo cristalino inodoro de color blanco	Polvo blanco a blanco cristalino inodoro
Solubilidad en agua (25 °C)	0.05 – 1 mg/mL	0.12 mg/mL
Solubilidad	Acetona, etanol, cloroformo, metanol	Acetona, etanol, cloroformo, metanol
Log P	1.68 – 1.93	1.525
Log S	-3.64 – -3.9	-2.99
Punto de fusión	260 – 264 °C	232.5 °C
pKa	-3.3 y 12.42	-2.9 y 12.59

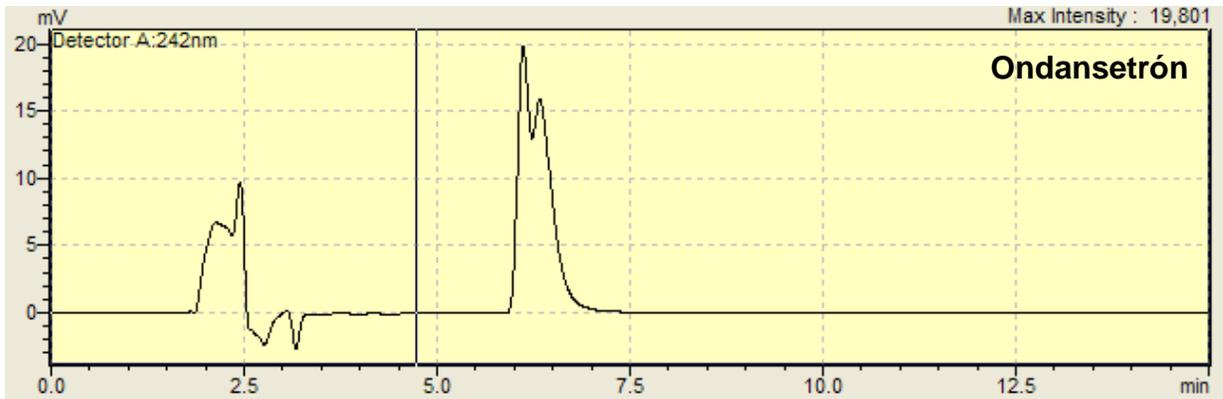


Figura 12. Cromatograma de DEX y Ondansetrón

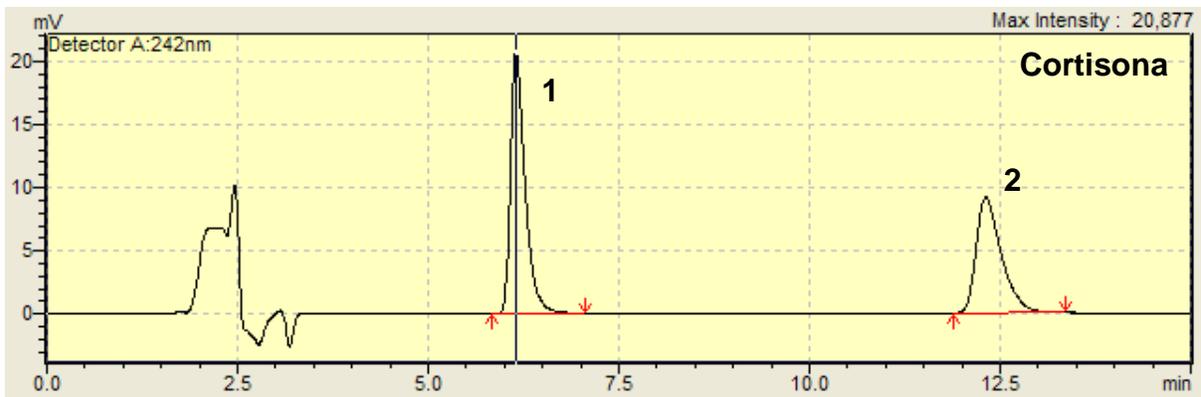


Figura 13. Cromatograma de DEX (1) y Cortisona (2)

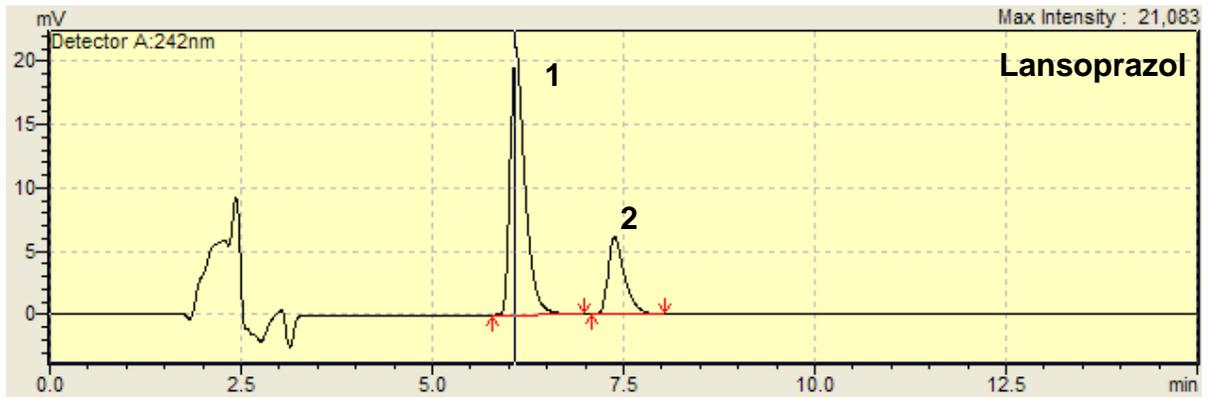


Figura 14. Cromatograma de DEX (1) y Lansoprazol (2)

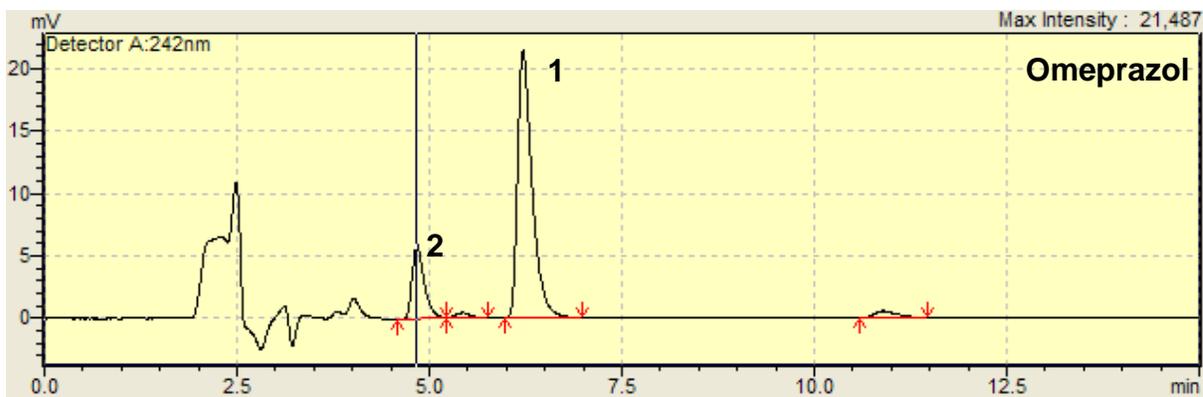


Figura 15. Cromatograma de DEX (1) y Omeprazol (2)

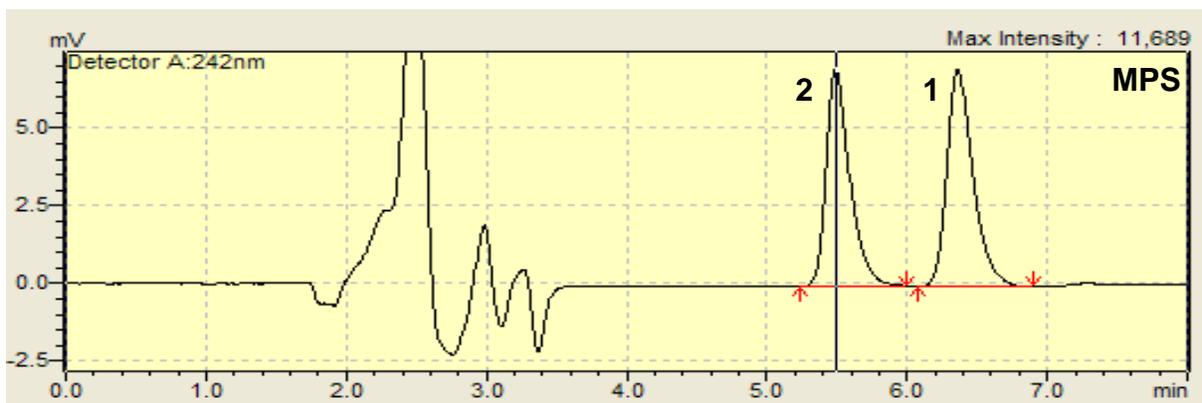


Figura 16. Cromatograma de DEX (1) y MPS (2)

6.1.4 Selección del disolvente de extracción

Los resultados mostraron que el mejor disolvente de extracción fue la mezcla de éter: diclorometano (40: 60 v/v), con el cual se obtuvieron recobros mayores al 70% tanto para DEX como la MPS.

6.1.5 Condiciones de extracción

En la tabla 13, se puede observar que se obtuvieron los mejores recobros al utilizar la agitación en vortex durante 30 segundos y un volumen de disolvente de extracción de 3 mL o 5 mL, por lo que se decidió utilizar el volumen menor. De igual forma, se demostró que, al alcalinizar la muestra de plasma, el porcentaje de recobro de la DEX era bajo.

En el diagrama 3 se describen las condiciones finales utilizadas para la cuantificación de dexametasona en plasma.

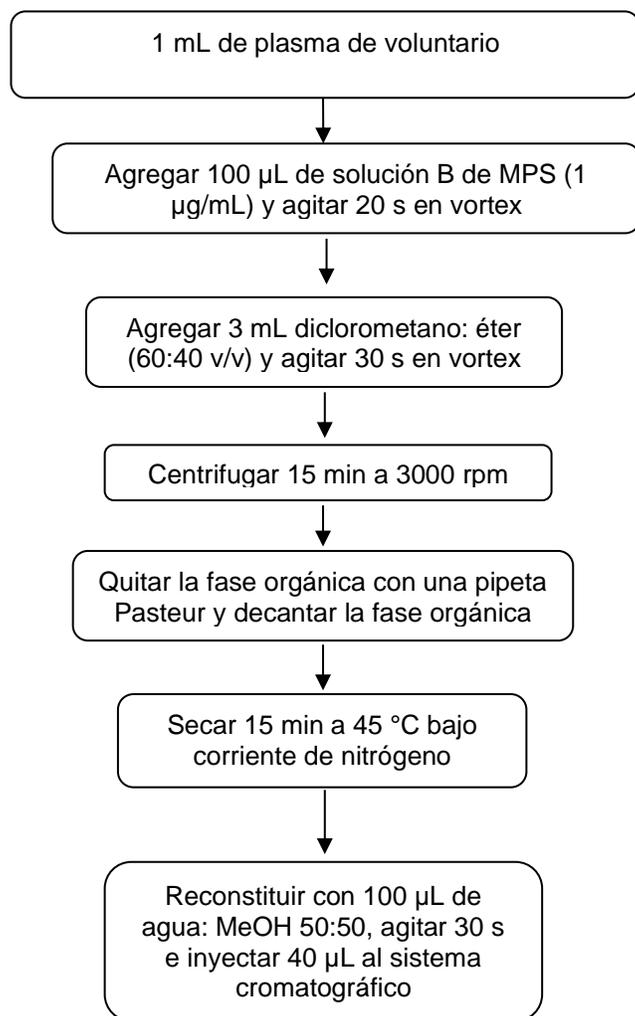


Figura 17. Diagrama del método de extracción empleado en el estudio

Tabla 13. Condiciones evaluadas para la extracción de DEX de muestras de plasma.

Factor	Condiciones	Recobro de DEX
Tiempo de agitación en vortex	Agitación vortex 30 s	80%
	Agitación vortex 1 min	70%
Tipo de agitación	Agitación vertical	75%
	Agitación horizontal	40%
Volumen de disolvente de extracción	3 mL	80%
	5 mL	80%
Alcalinizar	Sin alcalinizar	85%
	+ 250 µL de NaOH 0.025M	45%

6.1.6 Condiciones cromatográficas

Tabla 14. Condiciones cromatográficas

Condiciones cromatográficas	
Columna	Zorbax Eclipse XDB-C18, 5 μ m, 4.6 x 250 mm.
Fase móvil	Solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 7.0: Acetonitrilo (60:40 v/v)
Flujo	1.0 mL/min
Tiempo de corrida	8.0 min
Longitud de onda (λ)	242 nm

6.2 Validación del método analítico

A continuación, se presentan los resultados de validación del método siguiendo los lineamientos que marca la NOM-177-SSA1-2013.

6.2.1 Selectividad

En la figura 18 se muestra un cromatograma típico de una muestra blanco. El método cumple con los criterios de aceptación ya que las respuestas analíticas de las interferencias cercanas al tiempo de retención no fueron mayores al 20% para DEX y ni mayores al 5% para el EI.

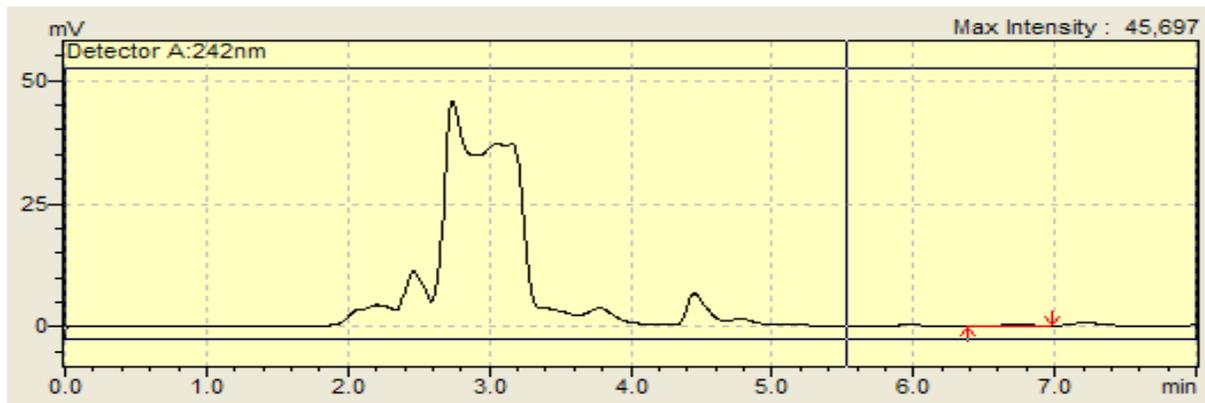


Figura 18. Cromatograma típico de una muestra blanco.

6.2.2 Acarreo

En la tabla 15 se presentan los resultados de una prueba de acarreo. Dado que la respuesta de DEX fue menor al 20% del LIC y al 5% del EI, confirmando que no existe efecto de acarreo con método desarrollado.

Tabla 15. Resultados obtenidos para la evaluación de selectividad y acarreo

Selectividad y Acarreo					
Muestra	Dexametasona		E. I.		FR
	TR	AREA	TR	AREA	
BCO1	No se detecta pico.	0	5.575	1652	N/A
LSC	6.428	122244	5.578	70034	1.75
BCO2	No se detecta pico.	0	5.564	1454	N/A
BCO2	No se detecta pico.	0	5.561	1413	NA
M0	No se detecta pico.	0	5.584	69820	N/A
C1	6.425	12737	5.579	76940	0.17

6.2.3 Límite Inferior de cuantificación

El límite inferior de cuantificación fue de 20 ng/mL donde la concentración recuperada está dentro del 20% de la concentración nominal.

6.2.4 Linealidad

En la figura 19 se muestra la curva promedio obtenida al graficar el factor de respuesta (área de DEX/área del EI) vs la concentración nominal de DEX. En la tabla 16 se muestran los valores de % de desviación absoluta de las 3 curvas evaluadas, encontrando que en todos los casos la desviación absoluta no fue mayor al 10%. Los resultados indican que el método es lineal en el intervalo de 20 – 200 ng/mL.

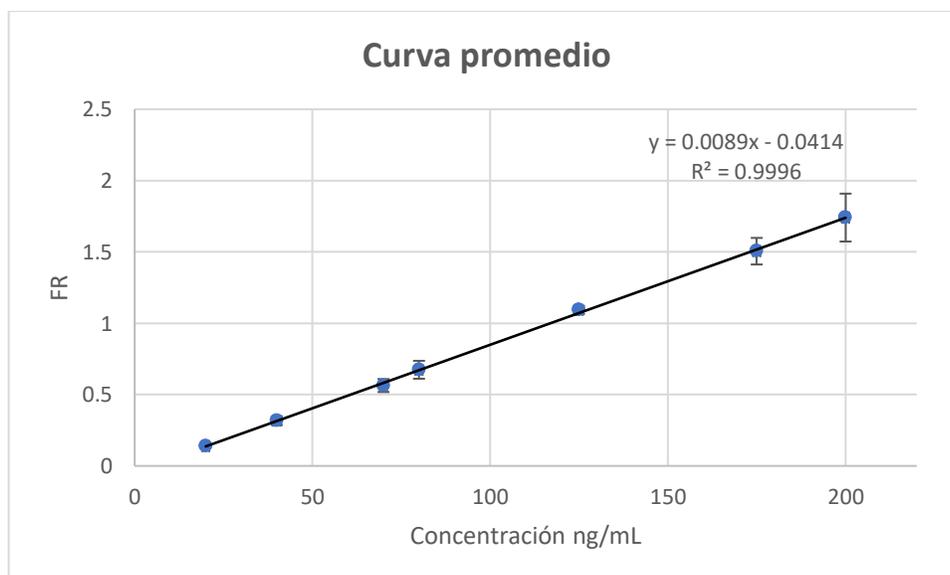


Figura 19. Curva promedio de calibración de DEX en plasma humano.

Tabla 16. Linealidad del método analítico. Valores de porcentaje de desviación absoluta de la concentración calculada con respecto a la concentración nominal de DEX

Concentración (ng/mL)	% de desviación absoluta		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
20	5.05	-14.57	6.60
40	-4.76	-5.80	10.07
70	0.59	6.48	1.87
80	-2.60	6.62	-5.65
125	1.83	-2.46	-5.90
175	3.37	-2.26	0.99
200	-2.81	1.21	1.76

6.2.5 Precisión y exactitud

En la tabla 17 se muestran los resultados obtenidos de repetibilidad y reproducibilidad y en la tabla 18 los resultados de exactitud del método. Dado que los coeficientes de variación fueron menores al 15% se comprueba que el método es preciso. De igual forma el método es exacto ya que los valores de porcentaje de desviación fueron menores al 15%.

Tabla 17. Precisión del método desarrollado

Muestras	Repetibilidad (n=5)				Reproducibilidad (n=15)		
	Concentración nominal (ng/mL)	Conc. recuperada promedio (ng/mL)	DE	CV%	Conc. recuperada promedio (ng/mL)	DE	CV%
LIC	20	19.32	1.48	7.67	20.18	2.11	10.44
MCB	60	57.03	3.18	5.57	59.91	4.18	6.97
MCM	100	92.59	3.67	3.97	97.61	4.92	5.04
MCA	150	136.89	1.76	1.28	146.06	8.13	5.56

Tabla 18. Exactitud del método desarrollado

% de desviación											
LIC (20 ng/mL)			MCB (60 ng/mL)			MCM (100 ng/mL)			MCA (150 ng/mL)		
DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 1	DIA 2	DIA 3
12.02	19.36	-4.34	5.33	-4.54	-5.61	4.86	0.24	-0.98	9.45	1.01	-2.34
9.67	-17.57	-11.24	7.17	-8.23	12.99	10.65	0.50	-8.40	8.98	-6.29	3.20
2.72	2.79	-3.41	12.33	-0.10	-7.33	9.89	3.43	0.07	7.91	2.91	-2.20
-5.36	-11.00	-6.68	-1.15	-2.25	-7.73	9.42	3.00	0.22	7.22	4.35	-5.42
-1.99	12.41	-10.92	1.04	-4.12	4.54	2.24	1.45	-0.79	10.12	-1.92	2.44
\bar{X}	-0.90		\bar{X}	0.16		\bar{X}	2.39		\bar{X}	2.63	

6.2.6 Estabilidad

En las tablas 19 y 20 se muestran los resultados de la estabilidad en muestras y en solución, respectivamente. Dado que los valores de las muestras se encontraron entre el $\pm 15\%$ del valor nominal, se concluye que las muestras son estables al menos durante 49 días en congelación a $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

En caso de las muestras en solución se encontró que las soluciones de DEX se pueden mantener en refrigeración (4°C) al menos durante 120 días y las soluciones de trabajo durante 21 días. La solución stock de MPS fue estable en refrigeración (a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 36 días.

Tabla 19. Estabilidad de DEX en plasma bajo distintas condiciones

Condición evaluada	Tiempo evaluado	MCB promedio (ng/mL)	Desviación	MCA promedio (ng/mL)	Desviación
Estabilidad corto plazo a temperatura ambiente	24.083 h	63.75	-6.25	154.01	-2.67
Estabilidad corto plazo en refrigeración	24 h	66.94	-11.57	147.39	1.74
Estabilidad muestra procesada - refrigeración	27.5 h	60.85	-1.42	165.85	-10.57
Estabilidad muestra procesada - automuestreador	39.883 h	64.22	-7.04	158.31	-5.54
Estabilidad a ciclos de congelación-descongelación	3 ciclos	62.76	-4.61	159.62	-6.42
Estabilidad a largo plazo	49 días	64.65	-7.75	149.55	0.30

Tabla 20. Estabilidad en solución de DEX y el EI

Solución	Tiempo (días)	% Obtenido con respecto a una solución recién preparada
Solución Stock DEX ($500\text{ }\mu\text{g/mL}$)	120	99.53
Solución de trabajo DEX ($0.4\text{ }\mu\text{g/mL}$)	21	95.95
Solución Stock MPS ($1000\text{ }\mu\text{g/mL}$)	36	102.45
Solución de trabajo MPS ($0.1\text{ }\mu\text{g/mL}$)	33	91.20

6.2.7 Análisis de muestras de voluntarios

En las tablas 21 - 25 se presentan los resultados de concentración plasmática vs tiempo de los voluntarios y los datos de las muestras control para la aceptación de la corrida analítica y en las figuras 20 – 23 se muestran los cromatogramas. El método fue adecuado para cuantificar las concentraciones después de la administración intravenosa, sin embargo, para la administración intranasal, en uno de los sujetos, la última concentración estuvo por abajo del límite de cuantificación, siendo necesario

encontrar condiciones que permitan cuantificar concentraciones más bajas que las establecidas en el método.

Tabla 21. Datos sujeto 1 - IV

Tiempo (h)	Muestra	Dexametasona		E. I.		FR	Concentración ng/mL
		TR (min)	AREA	TR (min)	AREA		
0.25	IV 1	6.335	95632	5.51	68851	1.39	147.189
0.5	IV 2	6.326	22733	5.488	25137	0.90	94.573
0.75	IV 3	6.329	16847	5.506	21475	0.78	81.558
1	IV 4	6.336	42607	5.514	78214	0.54	55.528
2	IV 5	6.333	23702	5.509	61848	0.38	37.991
3	IV 6	6.33	23616	5.509	73055	0.32	31.480
4	IV 7	6.329	9651	5.493	35121	0.27	26.217
8	IV 8	6.343	17574	5.52	75951	0.23	21.504

Tabla 22. Datos sujeto 1 - IN

Tiempo (h)	Muestra	Dexametasona		E. I.		FR	Concentración ng/mL
		TR	AREA	TR	AREA		
0.25	IN 1	6.335	11186	5.521	77642	0.14	12.024
0.5	IN 2	6.332	9613	5.497	21958	0.44	43.915
0.75	IN 3	6.336	12981	5.503	18095	0.72	74.271
1	IN 4	6.344	43632	5.52	79582	0.55	55.909
2	IN 5	6.333	21273	5.503	61211	0.35	34.115
3	IN 6	6.34	22056	5.514	82764	0.27	25.316
4	IN 7	6.339	18051	5.513	76906	0.23	21.866
8	IN 8	6.334	11172	5.511	82296	0.14	11.121

Tabla 23. Datos sujeto 2 - IV

Tiempo (h)	Muestra	Dexametasona		E. I.		FR	Concentración ng/mL
		TR	AREA	TR	AREA		
0.25	IV 1	6.381	80296	5.544	75991	1.06	112.109
0.5	IV 2	6.397	61832	5.552	72002	0.86	91.373
0.75	IV 3	6.392	50586	5.545	61635	0.82	87.389
1	IV 4	6.373	45838	5.536	68327	0.67	71.686
2	IV 5	6.393	42034	5.547	72880	0.58	61.825
3	IV 6	6.389	29568	5.546	75440	0.39	42.461
4	IV 7	6.376	21949	5.533	68630	0.32	34.903
8	IV 8	6.374	13033	5.531	59932	0.22	24.179

Tabla 24. Datos sujeto 2 - IN

Tiempo (h)	Muestra	Dexametasona		E. I.		FR	Concentración ng/mL
		TR	AREA	TR	AREA		
0.5	IN 2	6.391	34642	5.541	67564	0.51	55.117
0.75	IN 3	6.39	16384	5.539	22379	0.73	78.104
1	IN 4	6.386	52405	5.531	74080	0.71	75.515
2	IN 5	6.393	28536	5.543	71566	0.40	43.173
3	IN 6	6.376	6337	5.516	13807	0.46	49.484
4	IN 7	6.394	21047	5.543	72398	0.29	31.854
8	IN 8	6.386	14194	5.541	69029	0.21	22.938

Tabla 25. Datos de las muestras control del análisis de voluntarios.

Muestra	Dexametasona		E. I.		FR	Concentración (µg/mL)	Concentración Recuperada (ng/mL)	Desviación
	TR	AREA	TR	AREA				
MCB 1	6.384	42791	5.543	75548	0.57	0.6	0.607	-1.24
MCM 1	6.381	75053	5.533	75482	0.99	1.0	1.056	-5.58
MCA 1	6.385	108496	5.535	74699	1.45	1.5	1.536	-2.39
MCB 2	6.334	39062	5.51	67058	0.58	0.6	0.624	-4.05
MCM 2	6.347	70321	5.521	77989	0.90	1.0	0.959	4.13
MCA 2	6.351	88624	5.514	64347	1.38	1.5	1.457	2.86

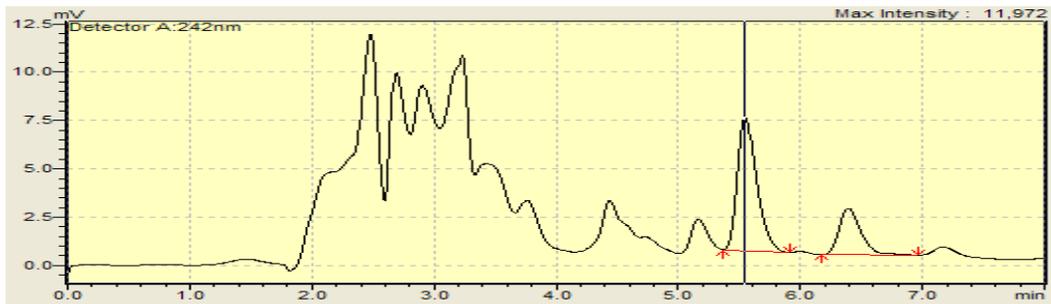


Figura 20. Cromatograma típico del voluntario 1 vía IV.

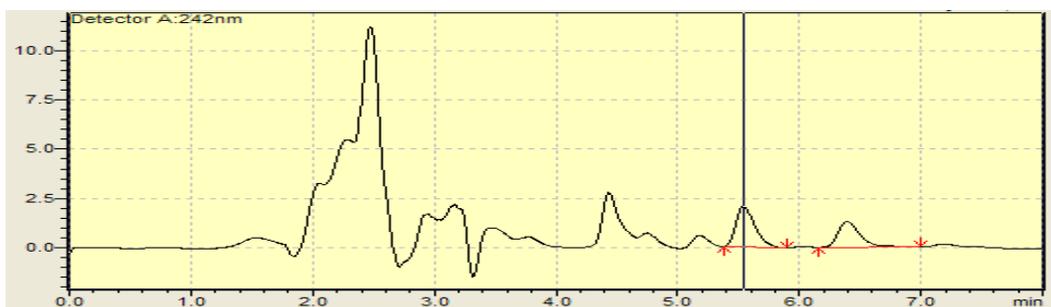


Figura 21. Cromatograma típico del voluntario 1 vía IN.

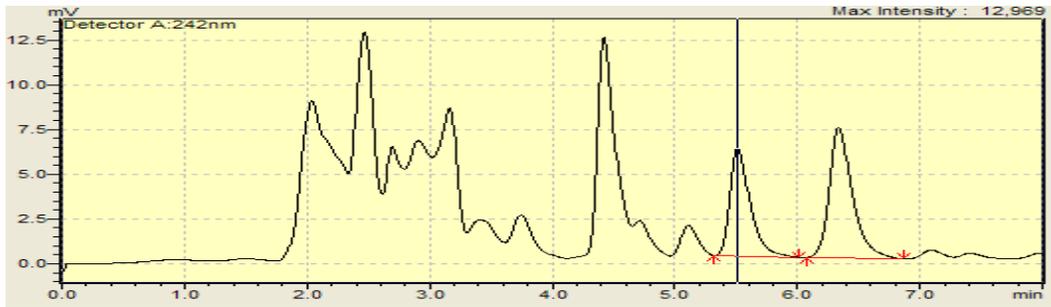


Figura 22. Cromatograma típico del voluntario 2 vía IV.

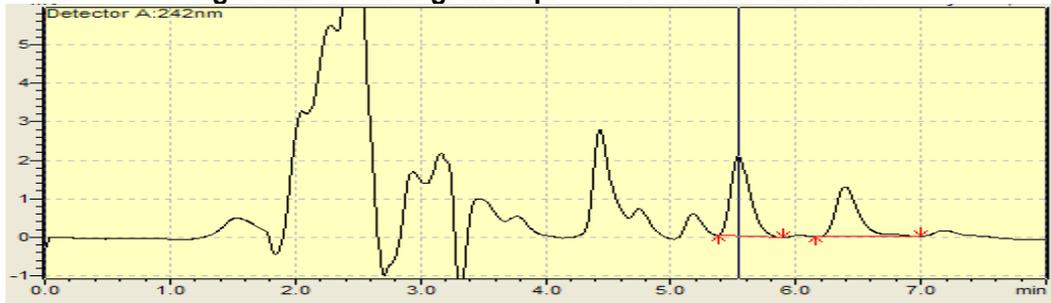


Figura 23. Cromatograma típico del voluntario 2 vía IN.

6.2.8 Análisis de datos

Para determinar los parámetros farmacocinéticos, los datos se analizaron usando el programa WinNonLin. Se encontró que para la administración IV el mejor modelo al que se ajustaron los datos fue dos compartimientos (figuras 24 y 25).

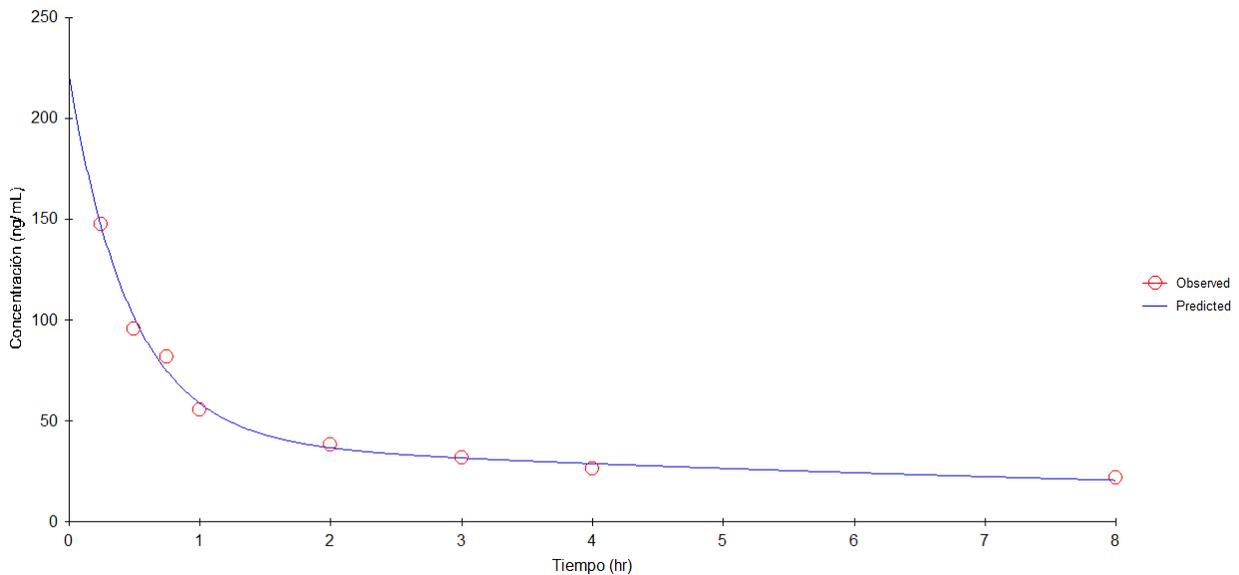


Figura 24. Ajuste de los datos del voluntario 1 a un modelo abierto de dos compartimientos después de la administración intravenosa de una dosis de 6 mg dexametasona.

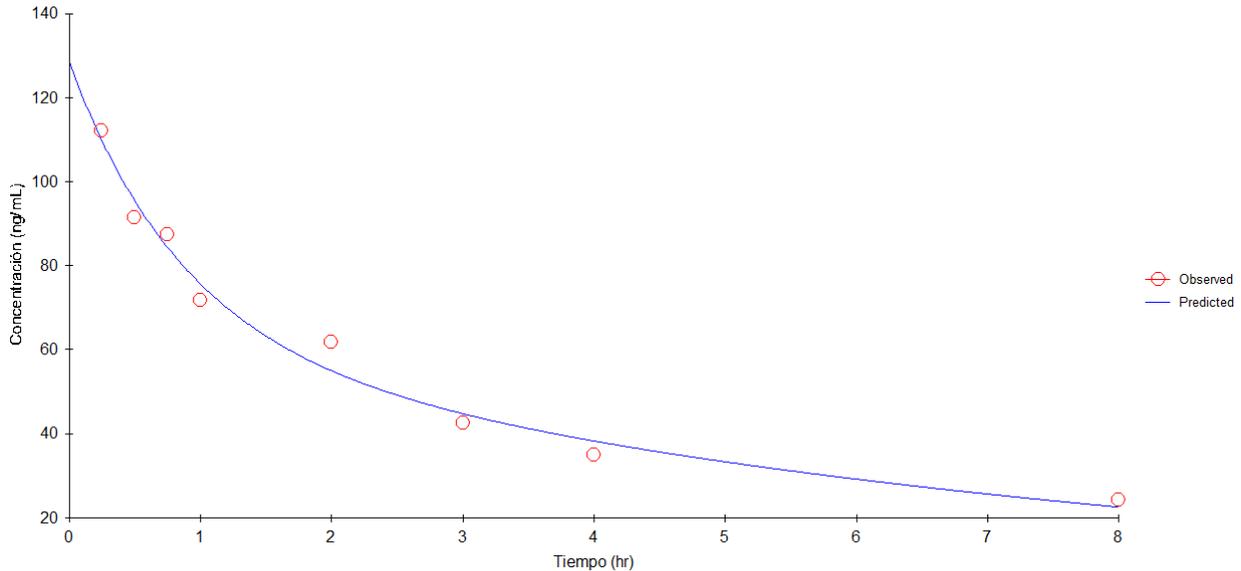


Figura 25. Ajuste de los datos del voluntario 2 a un modelo abierto de dos compartimentos después de la administración intravenosa de una dosis de 6 mg dexametasona.

Los parámetros farmacocinéticos obtenidos se presentan en la tabla 26.

Tabla 26. Parámetros farmacocinético de la administración IV

Parámetros	Unidades	Vol 1		Vol 2	
		Estimado	CV%	Estimado	CV%
AUC	hr*ng/mL	559.95	36.76	545.787	24.14
K10_HL	hr*ng/mL	1.755	39.64	2.944	27.85
Alpha	1/hr	2.121	15.51	1.171	51.58
Beta	1/hr	0.0845	60.11	0.1283	48.96
Alpha_HL	hr	0.326	15.5	0.5916	51.56
Beta_HL	hr	8.199	60.06	5.4002	48.92
A	ng/mL	181.002	8.41	65.6288	26.81
B	ng/mL	40.126	21.62	62.8639	31.85
Cmax	ng/mL	221.129	7.67	128.4927	8.82
CL	mL/hr	10700	36.8	10993.2801	24.17
AUMC	hr*hr*ng/mL	5654.732	100.47	3863.6148	68.9
MRT	hr	10.098	64.05	7.078	45.14
Vss	mL	10854	28.34	77821.064	22.15
V2	mL	81347	36.89	31125.8243	51.51
CLD2	mL/hr	36881	10.45	19881.7491	40.37

En el caso de la administración intranasal, no fue posible hacer el ajuste de datos a un modelo compartimental, por lo que se analizaron empleando un modelo no compartimental (figuras 26 y 27).

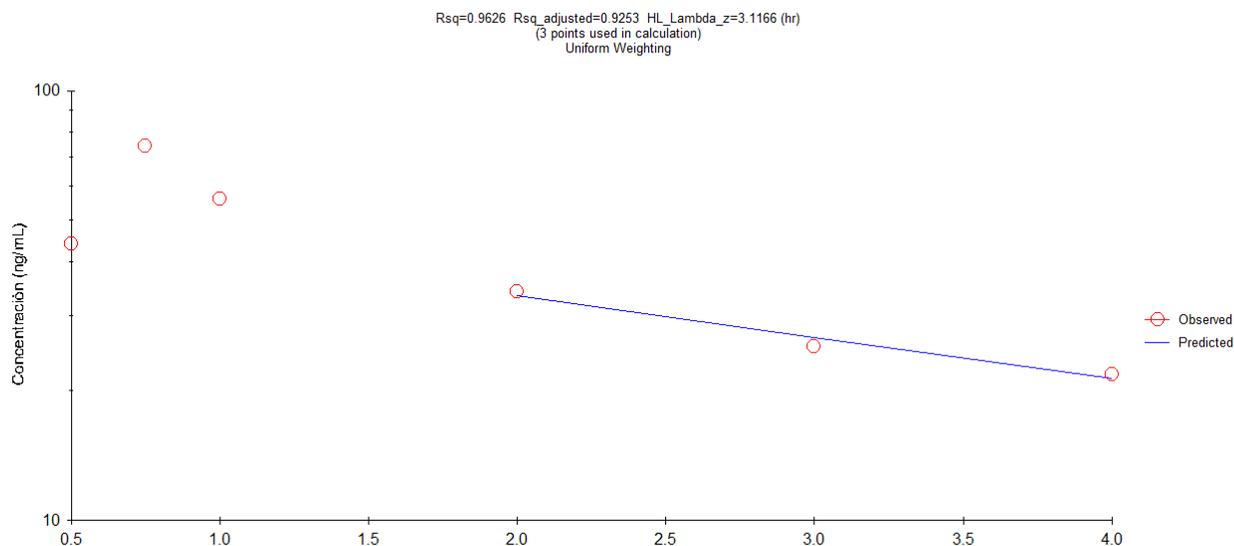


Figura 26. Sujeto 1 - IN. Modelo no compartimental

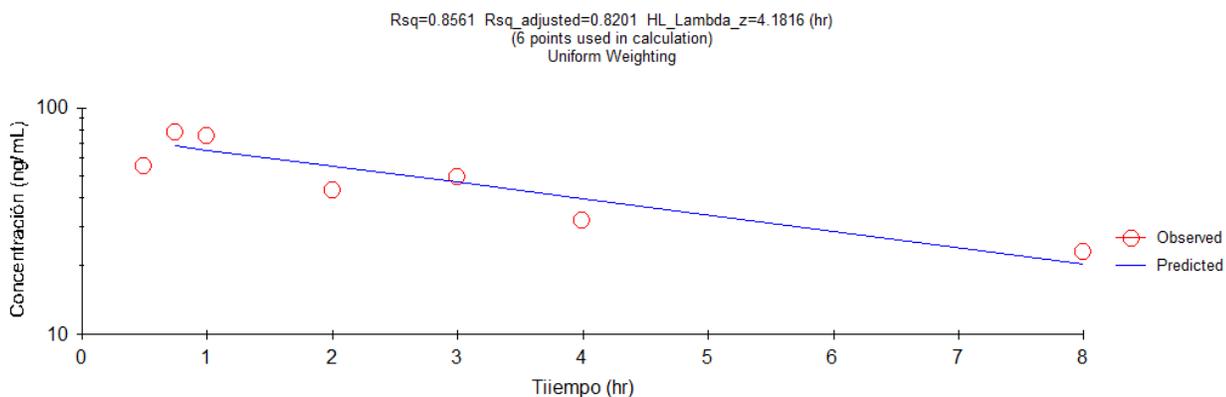


Figura 27. Sujeto 2 - IN. Modelo no compartimental.

En tabla 27 se presentan los parámetros farmacocinéticos, obtenidos en ambas vías de administración al emplear el modelo no compartimental. Al comparar los resultados con los previamente publicados, se encontró que los valores de aclaramiento, $t_{1/2}$ y el área bajo la curva fueron semejantes, lo cual apoya la validez del método desarrollado (Loew et al., 1986; Spoorenberg et al., 2014).

Tabla 27. Datos farmacocinéticos de los voluntarios 1 y 2 ambas vías, modelo no compartimental

Parámetros	Unidades	Vol 1		Vol 2	
		IV	IN	IV	IN
Lambda z	1/hr	0.0871	0.2224	0.1067	0.1658
HL_Lambda z	hr	7.962	3.1166	6.4984	4.1816
Tmax	hr	0.25	0.75	0.25	0.75
Cmax	ng/mL	147.189	74.271	112.109	78.104
CO	ng/mL	226.6812	NA	137.5508	NA
AUClast	hr*ng/mL	322.1416	140.343	374.6168	305.5598
Vz_F_obs	mL	121093.037	113039.946	93549.7353	81534.9986
Cl_F_obs	mL/hr	10541.994	25140.3243	9978.3578	13515.3606
MRTlast	hr	2.6318	1.7458	2.847	3.2482
MRTINF_obs	hr	9.9468	4.5267	8.324	6.6098

En las figuras 28 y 29, se presenta la comparación de los datos de la vía IV y la IN de cada voluntario. Se puede observar que la absorción por la vía intranasal fue más lenta con un valor de t_{max} de 0.75 h, a partir de ese tiempo, los perfiles fueron semejantes en ambas vías. Se requiere contar con un mayor número de sujetos para determinar la biodisponibilidad absoluta de la vía IN.

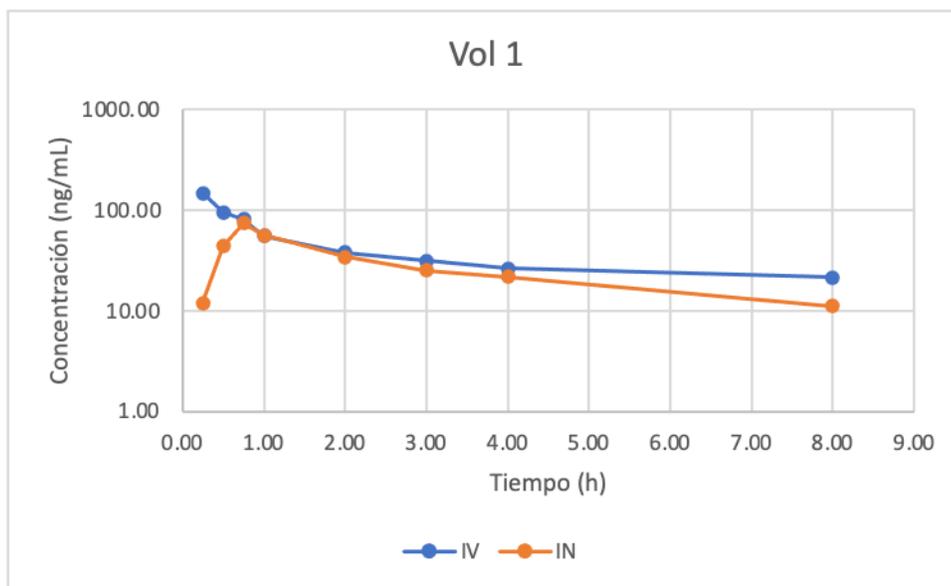


Figura 28. Comparación IV vs IN. Voluntario 1

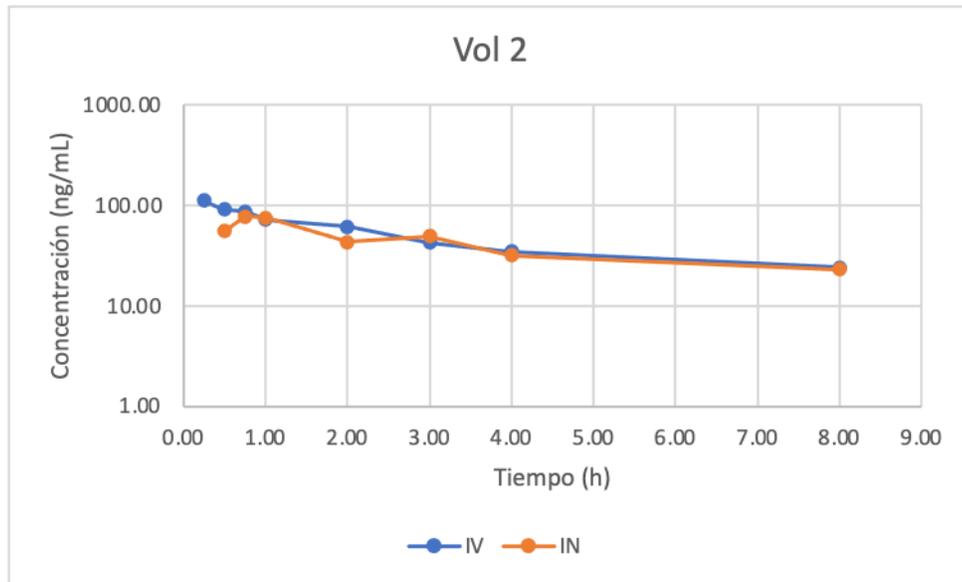


Figura 29. Comparación IV vs IN. Voluntario 2

Actualmente, no se cuentan con datos del uso de DEX como tratamiento en enfermedades neuroinflamatorias por la vía intranasal, por lo que el método desarrollado podrá ser utilizado para el análisis de muestras ya sea de voluntarios sanos o pacientes. Se requiere mejorar la sensibilidad del método en caso de que las dosis a administrar de DEX sean menores a 6 mg.

7. CONCLUSIONES

Se desarrolló y validó un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) acoplado a un detector UV, para la cuantificación de dexametasona en plasma humano.

- Se seleccionaron aquellas condiciones cromatográficas que permitieron la cuantificación de dexametasona en presencia de compuestos endógenos de la matriz, así como de los metabolitos, en el rango de trabajo (20 – 200 ng/mL) obteniendo resultados precisos y exactos.
- Se evaluaron las condiciones de extracción de dexametasona del plasma humano para tener una cuantificación óptima y lograr un recobro del analito mayor al 70%.
- Se validó el método desarrollado, tomando como guía la Normal Oficial Mexicana 177-SSA-2013.
- Se aplicó el método analítico para la cuantificación de muestras provenientes de un estudio piloto de farmacocinética en humanos y el análisis de estos datos para reafirmar la fiabilidad del método.
- Se obtuvieron resultados farmacocinéticos semejantes a lo reportado en la literatura determinando así su aplicabilidad y potencial implementación en la clínica.

8. PERSPECTIVAS

Para estudios posteriores se necesita aumentar el número de voluntarios para poder determinar la biodisponibilidad de la dexametasona por vía intranasal y para mejorar la sensibilidad del método podría tomarse mayor cantidad de muestra (2 mL) o cambiar el detector por uno más sensible, para mejorar la extracción se podría usar la extracción en fase sólida y mejorando también la selectividad.

Así en un futuro, el método podría ser utilizado para estudios de biodisponibilidad, farmacocinética o monitoreo terapéutico en pacientes a dosis aún menores a la utilizada en este estudio.

9. REFERENCIAS

- Ahmed, M. H., & Hassan, A. (2020). Dexamethasone for the Treatment of Coronavirus Disease (COVID-19): a Review. *SN Comprehensive Clinical Medicine*, 2(12), 2637–2646. <https://doi.org/10.1007/s42399-020-00610-8>
- Al-Owaidi, M. F., Alkhafaji, S. L., & Mahood, A. M. (2021). Quantitative determination of dexamethasone sodium phosphate in bulk and pharmaceuticals at suitable pH values using the spectrophotometric method. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research*, 12(4), 378–383. https://doi.org/10.4103/japtr.japtr_6_21
- Cárdenas, G., Chávez-Canales, M., Espinosa, A. M., Jordán-Ríos, A., Malagon, D. A., Murillo, M. F. M., Araujo, L. V. T., Campos, R. L. B., Wong-Chew, R. M., González, L. E. R., Cresencio, K. I., Velázquez, E. G., de la Cerda, M. R., Leyva, Y., Hernández-Ruiz, J., Hernández-Medel, M. L., León-Hernández, M., Quero, K. M., Monciváis, A. S., ... Sciutto, E. (2022). Intranasal dexamethasone: a new clinical trial for the control of inflammation and neuroinflammation in COVID-19 patients. *Trials*, 23(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13063-022-06075-5>
- Chen, Y. L., Jiang, X., & Weng, N. (2002). A liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the quantitative analysis of dexamethasone in human plasma. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 25(9), 1317–1334. <https://doi.org/10.1081/JLC-120004749>
- Czock, D., Keller, F., Rasche, F. M., & Häussler, U. (2005). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids. *Clinical Pharmacokinetics*, 44(1), 61–98. <https://doi.org/10.2165/00003088-200544010-00003>
- D.R.Consejo de Salubridad General. Comisión. (2017). *Consejo De Salubridad General Comisión Interinstitucional Del Cuadro Básico Y Catálogo De Insumos Del Sector Salud Cuadro Básico Y Catálogo De Medicamentos*.
- DiSabato, D. J., Quan, N., & Godbout, J. P. (2016). Neuroinflammation: the devil is in the details. *Journal of Neurochemistry*, 139, 136–153. <https://doi.org/10.1111/jnc.13607>
- DrugBank. (02 de Agosto de 2022). *DrugBank*. Obtenido de DrugBank: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01234>
- DrugBank. (30 de Enero de 2022). *DrugBank*. Obtenido de DrugBank: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00959>
- European Medicines Agency EMA, Guideline on bioanalytical method validation (2011). En línea, obtenida el 6 de diciembre del 2022
- Food and Drug Administration (FDA). (2019). *FDA Approved Drug Products: Hemady Dexamethasone Oral Tablets*.
- Food and Drug Administration FDA, Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry, (2018). En línea, obtenida el 6 de diciembre del 2022
- Gentile, D. M., Tomlinson, E. S., Maggs, J. L., Park, B. K., & Back, D. J. (2015). *and inhibition of 6-hydroxylation Dexamethasone Metabolism by Human Liver in Vitro . Metabolite Identification and Inhibition of 6-Hydroxylation*. May 1996.
- Harahap, Y., Sasongko, L., Prasaja, B., Indriati, E., & Lushtoom, W. (2009). Comparative Bioavailability of Two Dexamethasone Tablet Formulations in Indonesian Healthy Volunteers. *Arzneimittelforschung*, 59, 191–194.

- Hempen, C., Elfering, S., Mulder, A. H. L., Van Den Bergh, F. A. J. T. M., & Maatman, R. G. H. J. (2012). Dexamethasone suppression test: Development of a method for simultaneous determination of cortisol and dexamethasone in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Annals of Clinical Biochemistry*, *49*(2), 170–176. <https://doi.org/10.1258/acb.2011.011004>
- Heneka, M. T., Kummer, M. P., & Latz, E. (2014). Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Immunology*, *14*(7), 463–477. <https://doi.org/10.1038/nri3705>
- Kwon, H. S., & Koh, S. H. (2020). Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Translational Neurodegeneration*, *9*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40035-020-00221-2>
- Leng, F., & Edison, P. (2021). Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nature Reviews Neurology*, *17*(3), 157–172. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-00435-y>
- Loew, D., Schuster, O., & Graul, E. H. (1986). Dose-dependent pharmacokinetics of dexamethasone. *European Journal of Clinical Pharmacology*, *30*(2), 225–230. <https://doi.org/10.1007/BF00614309>
- Mehta, J., Rolta, R., Mehta, B. B., Kaushik, N., Choi, E. H., & Kaushik, N. K. (2022). Role of Dexamethasone and Methylprednisolone Corticosteroids in Coronavirus Disease 2019 Hospitalized Patients: A Review. *Frontiers in Microbiology*, *13*(February), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.813358>
- Nash, T. E., Mahanty, S., & Garcia, H. H. (2011). Corticosteroid use in neurocysticercosis. *Expert Review of Neurotherapeutics*, *11*(8), 1175–1183. <https://doi.org/10.1586/ern.11.86>
- Noreen, S., Maqbool, I., & Madni, A. (2021). Dexamethasone: Therapeutic potential, risks, and future projection during COVID-19 pandemic. *European Journal of Pharmacology*, *894*(January), 173854.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. En línea obtenida el 6 de diciembre del 2022 <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.173854>
- Oakley, R. H., & Cidlowski, J. A. (2013). The biology of the glucocorticoid receptor: New signaling mechanisms in health and disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *132*(5), 1033–1044. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.09.007>
- Oray, M., Abu Samra, K., Ebrahimiadib, N., Meese, H., & Foster, C. S. (2016). Long-term side effects of glucocorticoids. *Expert Opinion on Drug Safety*, *15*(4), 457–465. <https://doi.org/10.1517/14740338.2016.1140743>
- Pal, M., Berhanu, G., Desalegn, C., & Kandi, V. (2020). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2): An Update. *Cureus*, *2*(3). <https://doi.org/10.7759/cureus.7423>
- Pedersen, S. F., & Ho, Y. C. (2020). SARS-CoV-2: A storm is raging. *Journal of Clinical Investigation*, *130*(5), 2202–2205. <https://doi.org/10.1172/JCI137647>
- Pérez-Osorio, I. N., Espinosa, A., Velázquez, M. G., Padilla, P., Bárcena, B., Frago, G., Jung-Cook, H., Besedovsky, H., Meneses, G., & Conde, E. L. S. (2021). Nose-to-brain delivery of dexamethasone: Biodistribution studies in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *378*(3), 244–250. <https://doi.org/10.1124/jpet.121.000530>

- Ramamoorthy, S., & Cidlowski, J. A. (2016). Corticosteroids. Mechanisms of Action in Health and Disease. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 42(1), 15–31. <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2015.08.002>
- Razzaq, S. N., Ashfaq, M., Mariam, I., Khan, I. U., Razzaq, S. S., & Mustafa, G. (2017). Stability indicating rp-hplc method for simultaneous determination of gatifloxacin and dexamethasone in binary combination. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 62(3), 3572–3577. <https://doi.org/10.4067/s0717-97072017000303572>
- Safavynia, S. A., & Goldstein, P. A. (2019). The role of neuroinflammation in postoperative cognitive dysfunction: Moving from hypothesis to treatment. *Frontiers in Psychiatry*, 9(January). <https://doi.org/10.3389/fpsy.2018.00752>
- Schweingruber, N., Reichardt, S. D., Lühder, F., & Reichardt, H. M. (2012). Mechanisms of glucocorticoids in the control of neuroinflammation. *Journal of Neuroendocrinology*, 24(1), 174–182. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02161.x>
- Song, Y. K., Park, J. S., Kim, J. K., & Kim, C. K. (2004). HPLC determination of dexamethasone in human plasma. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 27(14), 2293–2306. <https://doi.org/10.1081/JLC-200025726>
- Spoorenberg, S. M. C., Deneer, V. H. M., Grutters, J. C., Pulles, A. E., Voorn, G. P., Rijkers, G. T., Bos, W. J. W., & Van De Garde, E. M. W. (2014). Pharmacokinetics of oral vs. intravenous dexamethasone in patients hospitalized with community-acquired pneumonia. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 78(1), 78–83. <https://doi.org/10.1111/bcp.12295>
- Swartz, S. L., & Dluhy, R. G. (1978). Corticosteroids: Clinical Pharmacology and Therapeutic Use. *Drugs*, 16(3), 238–255. <https://doi.org/10.2165/00003495-197816030-00006>
- Yang, R., & Yu, Y. (2021). Glucocorticoids are double-edged sword in the treatment of covid-19 and cancers. *International Journal of Biological Sciences*, 17(6), 1530–1537. <https://doi.org/10.7150/ijbs.58695>
- Yang, Y., Li, H., Gao, K., Liu, M., Sun, Y., Yan, T., Fawcett, J. P., Cui, Y., & Gu, J. (2008). Simultaneous quantitation of dexamethasone palmitate and dexamethasone in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 862(1–2), 119–124. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.11.033>