



Piroksikamın pK_a Değerinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Belirlenmesi

Murat Soyseven¹, Burcu Sezgin^{2*}, Göksel Arlı^{1,3}

^{1*} Anadolu Üniversitesi, Yunus Emre Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, 26470, Eskişehir, Türkiye, (ORCID: 0000-0002-6433-2392), msoyseven@anadolu.edu.tr

² Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir Meslek Yüksekokulu, Çevre Koruma Teknolojileri Bölümü, Eskişehir, Türkiye (ORCID: 0000-0003-0279-4839), bsezgin@ogu.edu.tr

³ Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, 26470, Eskişehir, Türkiye, (ORCID: 0000-0003-2559-1196), galtiokk@anadolu.edu.tr

(International Conference on Design, Research and Development (RDCONF) 2021 – 15-18 December 2021)

(DOI: 10.31590/ejosat.1039582)

ATIF/REFERENCE: Soyseven, M., Sezgin, B. & Arlı, G. (2021). Piroksikamın pK_a Değerinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Belirlenmesi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (32), 711-715.

Öz

Bu çalışmada bir nonsteroid anti-inflamatuvar ilaç olan piroksikamın ters faz sıvı kromatografi yöntemiyle farklı asetonitril-su ikili karışımlarındaki ve sudaki asidik iyonlaşma sabitleri (pK_a) belirlenmiştir. Piroksikamın kromatografik davranışına hareketli fazın pH'ı ve çözücü yüzdesinin birleştirilmiş etkisini incelemek amacıyla SVEA C18 (5 μ m, 150 mm x 4.6 mm) YPSK analiz kolonu ve farklı oranda asetonitril-su (%30, %35 ve %40 (h/h)) ikili karışımlarından oluşan, farklı pH değerlerine (3,13-6,18) sahip hareketli fazlar kullanılmıştır. Asidik iyonlaşma sabitleri doğrusal olmayan regresyon modeli kullanılarak tahmin edilmiştir. Piroksikamın sudaki pK_a değeri mol kesri- pK_a yöntemiyle hesaplanmıştır. Veriler literatürde farklı tekniklerle elde edilmiş olanlarla kıyaslanmış ve uyumlu olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: pK_a , Piroksikam, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi.

Determination of pK_a Value of Piroxicam by High Performance Liquid Chromatography

Abstract

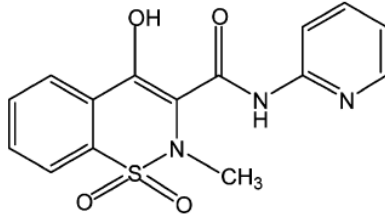
In this study, acid ionization constants (pK_a) of piroxicam, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, in different acetonitrile-water binary mixtures and water were determined by reverse phase liquid chromatography method. SVEA C18 (5 μ m, 150 mm x 4.6 mm) HPLC analysis column and different ratios of acetonitrile-water (30%, 35%, and 40% (v/v)) binary mixtures with different pH values (3.13-6.18) were used to investigate the combined effect of pH of the mobile phase and percentage of solvent on the chromatographic behavior of piroxicam. Acidic ionization constants were estimated using a nonlinear regression model. The pK_a value of piroxicam in water was calculated by the mole fraction- pK_a method. The data were compared with values obtained by different techniques in the literature and were found to be compatible.

Keywords: pK_a , Piroxicam, High Performance Liquid Chromatography.

* Sorumlu Yazar: bsezgin@ogu.edu.tr

1. Giriş

Piroksikam (4-hidroksi-2-metil-N-(piridin-2-il)-2H-1,2-benzotiazin-3-karboxamid-1,2-dioksit) iyi bilinen bir nonsteroid anti-inflamatuvardır. Fizyolojik bir pH'da iyonize olabilen ve suda çözünmeyen bir ilaçtır. Ankilozan spondilit, romatoid artrit ve steoartrit gibi kas-iskelet sistemi ve eklem bozuklukları ile ilişkili inflamasyonun akut veya uzun süreli tedavisi için kullanılan bir analjezik ilaçtır. Piroksikam, esas olarak prostaglandin sentezi inhibisyonu ve ayrıca lökosit göçü ve fagosit aktivitesinin inhibisyonu ile bir anti-inflamatuar ajan olarak hareket eder. (Starek & Krzek, 2009)



Şekil 1. Piroksikamın molekül yapısı (Starek & Krzek, 2009).

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) sağlıktan ziraate kadar fen bilimlerinin birçok alanında duyarlılık, tekrarlanabilirlik, nicel tayinlere kolaylıkla uyarlanabilirlik, sıcaklıkla kolayca bozunabilen veya uçucu olmayan bileşiklerin ayrılmasına uygunluk gibi çeşitli üstünlükleri nedeniyle sıklıkla tercih edilen bir analitik ayırma tekniğidir. Bir sıvıda çözünebilir bileşenlerin (ilaç etken maddeleri, aminoasitler, şekerler, vitaminler, antibiyotikler, pestisitler, gıda katkı maddeleri, gıda toksinleri vb.) bu teknik ile nitel ve nicel olarak hassas, hızlı ve güvenilir şekilde tespit edilmesi mümkündür (Sezgin, Arli, & Can, 2021; Soyseven, Kaynak, Çelebier, Aboul-Enein, & Arli, 2020, Moldoveanu & David, 2002; Moldoveanu & David, 2013a; Snyder, Kirkland, & Dolan, 2011).

YPSK yönteminde kullanılan hareketli faz polar ve kullanılan kolon apolar ise teknik ters faz kromatografi adını alır. Ters faz YPSK tekniğinde, iyonlaşabilir bir bileşiğin alıkonması, maddenin hidrofobikliğine ve iyonizasyon derecesine bağlıdır, bu da hareketli faz pH'ı ve analitin asidik iyonlaşma sabiti (pK_a) değeri ile doğrudan ilgilidir. Hareketli fazdaki organik madde yüzdesinin de bu parametreleri etkilediği bilinmektedir. Bu nedenle, YPSK analizlerinde hassas, doğru ve kesin sonuçlar elde etmek için pH kontrolü çok önemlidir. YPSK kromatogramlarında elde edilen pikler ancak birbirlerinden tam ayrıldığı zaman tek bir moleküle ait olmuş olur. Alıkonma faktörü (k') ve seçicilik (α) değerleri iyi bir pik ayırımı elde edip etmediğimizi gösteren parametreler arasında yer alır. Özellikle iyonize olabilen bileşiklerin analizinde, hareketli faz pH'ındaki küçük değişiklikler alıkonma sürelerinde çarpıcı değişiklikler meydana getirebilir. Bu durum k' ve α değerlerini de etkiler. Dolayısıyla, ayırma için kullanılacak hareketli faz pH'ının belirlenmesi önemli bir yere sahiptir. (Han ve ark., 2012; Moldoveanu & David, 2013a, 2013b; Rosés, Canals, Allemann, Siigur, & Bosch, 1996; Subirats, Rosés, & Bosch, 2007; Tindall & Dolan, 2003).

k' değeri, maddelerin bağıl alıkonmasının bir ifadesidir ve bir analitin bir kromatografi kolonundaki alıkonma zamanının ölçüsüdür. Bu değer hesaplanması için maddelerin kolonda

tutunma zamanlarının (t_R) yanı sıra t_0 adı verilen ölü zamanın da belirlenmesi gerekir. t_0 kolonda tutunmayan maddenin alıkonma zamanını ifade eder. Genellikle urasil, potasyum bromür (KBr) gibi bileşikler t_0 belirteci olarak kullanılır. Bu değer **Eşitlik 1.**'de belirtildiği gibi hesaplanır;

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (1)$$

k' değerini sabit faz (kolon özellikleri) ve hareketli faz (organik faz yüzdesi ve pH vs.) etkiler. Yapılan çalışmalarda genel olarak bu değer 2-10 arasında olması ideal olarak değerlendirilir. (Skoog, Holler & Crouch, 2017).

Asidik iyonlaşma sabiti (pK_a), maddelerin farklı pH değerlerindeki iyonlaşma derecesinin bir ölçüsüdür. İlaç etken maddeleri için bu pK_a değerleri ile maddenin farklı ortamlardaki çözünürlükleri arasında bir ilişki vardır. Bu ilişki ilaçların organizma içindeki davranışını belirlemeye olanak sağlar. İlaçların iyonlaşma özellikleri çözünürlük gibi fizikokimyasal özellikleri yanında metabolizma, proteinlere bağlanma, geçirgenlik gibi hücre ve ilaç arasındaki etkileşimlerle ilgili parametreleri de etkilemektedir. (Ishihama ve ark., 2002).

Maddelerin pK_a değerlerinin belirlenmesinde spektrometrik, potansiyometrik ve klasik titrasyon yöntemleri yanında son yıllarda YPSK yöntemi sıklıkla uygulanmaktadır. Titrasyon yöntemlerinin pK_a tayini yapılacak madde için uygun çözünürlük ve fazla miktarda örnek gerektirmesi, potansiyometrik yöntemlerin çözünürlüğü $100 \mu\text{M}$ 'dan yüksek bileşiklerle sınırlı olması YPSK ile pK_a tayin yöntemini ön plana çıkarmaktadır. YPSK yöntemi, düşük çözünürlükte, saflık gerektirmeyen ve az miktarda örnek ile maddelerin pK_a değerlerinin belirlenmesine olanak sağlar. Dezavantajları ise standart sapmaların nispeten yüksek olması ve çalışılan pH aralığının kolon stabilitesi ile sınırlı olmasıdır. Kullanılan ilaçların çoğunun düşük çözünürlüğe sahip olması özellikle ters faz YPSK yöntemini ön plana çıkarmaktadır. (Babic ve ark., 2007; Demiralay, Alsancak ve Özkan, 2009; Demiralay ve ark., 2012).

YPSK yöntemi ile pK_a tayini, değişen hareketli faz pH değerleri ile maddenin alıkonma faktörleri arasındaki ilişkiden yararlanılarak gerçekleştirilir. Alıkonma faktörleri ve hareketli faz pH değerleri kullanılarak elde edilen sigmoidal eğrilerin dönüm noktaları maddelere ait pK_a değerlerini verir. Maddenin su ve organik çözücü içeren ortamda elde edilen pK_a değerleri kullanılarak mol kesri- pK_a yöntemi ve Yasuda-Shedlovsky gibi yöntemlerle maddenin su ortamındaki pK_a değeri hesaplanabilir (Avdeef ve ark., 1999; Demiralay, Alsancak ve Özkan, 2009; Demiralay ve ark., 2012).

Bu çalışmada, ters faz YPSK yöntemi ile çeşitli asetonitril-su ikili karışımlarında piroksikamın pK_a değerlerinin belirlenmesi ve bu veriler kullanılarak mol kesri- pK_a yöntemi ile piroksikamın sudaki pK_a değerinin hesaplanması amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Piroksikam ve Urasil standart maddeleri Sigma-Aldrich (ABD), YPSK saflıktaki ACN Merck (Almanya), pH ayarlamalarında kullanılan o-fosforik asit ve fosfat tamponu hazırlamak için kullanılan Na_2HPO_4 Sigma-Aldrich (ABD) firmalarından, tüm standart çözeltiler ve tampon hazırlamada

kullanılan su (A_{QDD} : $<0,55 \mu\text{S/cm}$) ise Stakpure (Almanya) ultra-saf su arıtma sisteminden temin edilmiştir.

2.2. Kullanılan Cihazlar

Kromatografik çalışmalar için entegre gradient pompa, otomatik örnekleyci, iletişim ünitesi, kolon fırını, foto diyot dizisi dedektörü ve gaz giderme ünitesinden oluşan Shimadzu marka Nexera-i LC-2040C 3D model Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi cihazı (Tokyo, Japan) kullanılmıştır. Veriler YPSK sistemine bağlı Shimadzu LabSolution LCsolution v1.11 SP1 veri analiz programı (Tokyo, Japan) ile işlenmiştir. Çözeltiler içindeki çözünmüş gazların uzaklaştırılmasında LabCompanion marka CS-10 model ultrasonik banyo (Seoul, Korea), tartım işlemlerinde Ohaus marka PA214C model hassas terazi sistemi (USA), pH ölçümlerinde Mettler Toledo marka SevenCompact S220 model pH/iyon metre (İsviçre) kullanılmıştır. Hareketli fazlar, BFC marka S2500 vakum cihazına ile bütünleşik mobil faz süzme düzenek sistemi ile süzülmüştür. Sabit faz olarak SVEA C18 (5 μm , 150 mm x 4.6 mm) YPSK analiz kolonu kullanılmıştır. Çözelti süzme işlemlerinde 50 mm çaplı ve 0.2 μm gözenek boyutuna sahip Whatman (Almanya) rejener selüloz membran filtreler, piroksikam içeren çözeltilerin süzülmesinde ise 13 mm çapında 0.2 μm gözenek boyutuna sahip Orange Scientific (Belçika) steril polivinilidenflorür (PVDF) membran filtreler kullanılmıştır.

2.3. Standart ve Hareketli Faz Çözeltilerinin Hazırlanması

Pirosikamın standart stok çözeltisi için 25 mg piroksikam standart maddesi tartılıp 25 mL balon jodede ACN kullanılarak çözülmüş ve derişimi $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ olacak şekilde hazırlanmıştır. Urasil standart stok çözeltisi de aynı şekilde 25 mg urasil standart maddesi tartılıp 25 mL balon jodede ACN kullanılarak çözülmüş ve derişimi $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ olacak şekilde hazırlanmıştır. Çözeltiler enjeksiyondan önce PVDF filtreler aracılığı ile süzülmüştür. Hazırlanan stok çözeltiler 4 °C'de buzdolabında saklanmıştır. YPSK analizleri için piroksikam ve urasil standart stok çözeltileri hareketli fazlar ile seyreltilerek son derişim piroksikam için $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ve urasil için $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ olacak şekilde seyreltilmiştir.

Fosfat tamponu hazırlamak için 1,41 g Na_2HPO_4 tartılarak su ortamında çözülmüş ve 1000 mL hacme tamamlanmıştır. Hazırlanan tampon çözeltisi olası çözünmeyen partiküllerden arındırmak için selüloz membran filtreden vakum altında süzülmüştür. Çözünmüş gazların giderilmesi için yaklaşık 10 dk ultrasonik banyoda tutulmuştur.

Hareketli faz çözeltileri sırasıyla fosfat tamponu (10 mM): asetonitril (30:70 h/h); fosfat tamponu (10 mM): asetonitril (35:65 h/h); fosfat tamponu (10 mM): asetonitril (40:60 h/h) karışımı içerecek şekilde hazırlanmış ve 3,13-6,18 aralığında değişen farklı pH'larda çözeltiler hazırlanmıştır. Ölçümler pHmetre aracılığı ile yapılmış ve pH ayarlamalarında o-fosforik asit kullanılmıştır.

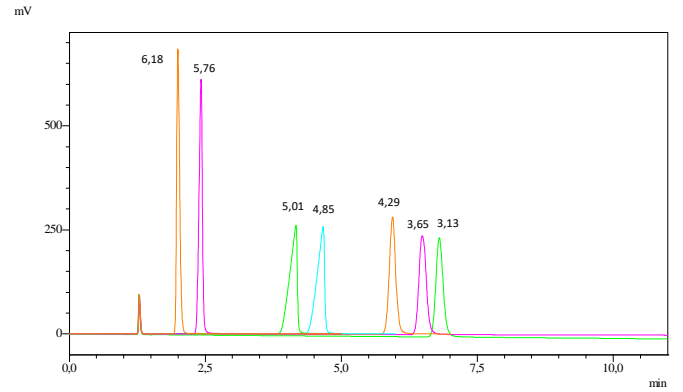
2.4. Kromatografik Çalışmalar

YPSK çalışmaları, $1,0 \text{ mL} \cdot \text{dk}^{-1}$ akış hızında SVEA C18 (5 μm , 150 mm x 4.6 mm) YPSK analiz kolonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analitlerin dedektör yanıtları 254 nm dalga boyuna ayarlı foto diyot dizisi dedektör ile ölçülmüştür. Kolon sıcaklığı 25 °C, enjeksiyon hacmi ise 5 μL olarak uygulanmıştır. Hareketli faz olarak farklı pH değerlerinde (3,13-6,18)

ayarlanmış olan ve sırasıyla ACN:fosfat tamponu (10 mM) (30:70 h/h); ACN:fosfat tamponu (10 mM) (35:65 h/h); ACN:fosfat tamponu (10 mM) (40:60 h/h) karışımı içeren seriler kullanılmıştır. Ölü zaman belirteci olarak urasil kullanılmıştır. Ölçümler üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Veriler ortalama değerler ve standart sapmalar hesaplanarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

3. Araştırma Sonuçları ve Tartışma

Piroksikamın pK_a değerleri, %30, %35 ve %40 (h/h) ACN-su ikili karışımları için pH 3,13-6,18 arasında değişen hareketli faz pH değerleri ile piroksikamın k' arasındaki sigmoidal ilişkiye göre belirlenmiştir. Şekil 2.'de pH 3,13-6,18 arasında değişen hareketli faz pH değerleri için piroksikamın optimum koşullar altında elde edilmiş olan temsili kromatogramı verilmiştir. Piroksikam gibi zayıf asidik ilaçlar bazik pH'da iyonize olduklarından, bazik mobil fazlar ile bir lipofilik C18 sabit fazdan hızla, asidik hareketli fazlardan ise daha yavaş elüe olma eğilimindedirler (Çelebier ve ark., 2020). Yapılan çalışmada bu ifade ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Artan hareketli faz pH değerine bağlı olarak piroksikamın alıkonma süresinin azaldığı görülmektedir. Piroksikam, asidik pH'da (pH 3,13) daha geç ve nispeten bazik pH (6,18) değerlerinde daha erken kolonu terk etmiştir (Şekil 2).



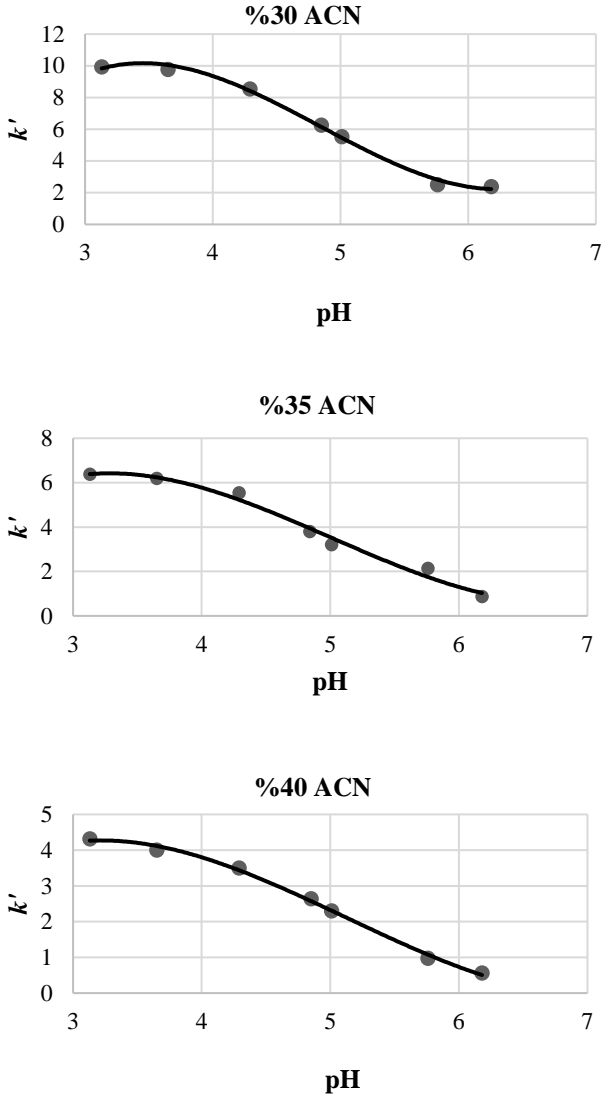
Şekil 2. Piroksikam için %40 (h/h) ACN-su ortamında pH (3,13-6,18) aralığında elde edilen temsili kromatogramlar

Hareketli fazın pH değeri k' değerlerine karşı grafiğe geçirildiğinde, pH ve k' değerleri arasında Şekil 3'de verilen sigmoidal ilişkiler elde edilmiştir. Bu ilişkilerden %30, %35 ve %40 (h/h) ACN-su ikili karışımları için piroksikamın pK_a değerleri hesaplanmıştır (Tablo 1). Bu değerlerin literatürdeki değerlerle uyumlu olduğu görülmüştür (Çelebier ve ark., 2020; Demiralay ve ark., 2009).

Tablo 1. Piroksikamın %30, %35 ve %40 (h/h) ACN-su ortamlarındaki pK_a değerleri

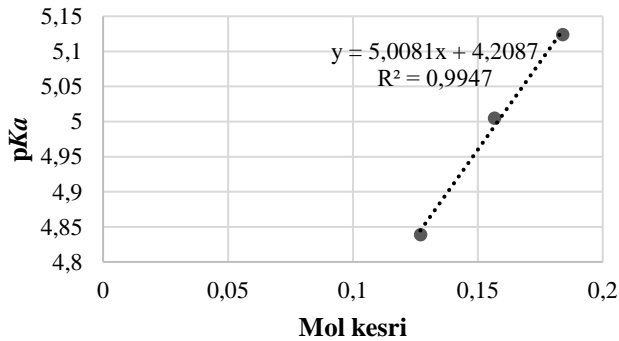
ACN (%)	$pK_a \pm SS$
30	$4,839 \pm 0,037$
35	$5,003 \pm 0,010$
40	$5,124 \pm 0,005$

SS: standart sapma



Şekil 3. Piroksikamın %30, %35 ve %40 (h/h) ACN-su ortamlarındaki pH-k' ilişkisi

Piroksikamın sudaki pKa değerinin hesaplanması için ise mol kesri-pKa yaklaşımı kullanılmıştır. Hareketli fazdaki ACN mol kesri, bulunan pKa değerlerine karşı grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen doğrusal eşitliklerin kesim noktasından piroksikamın su ortamındaki pKa değeri 4,209 olarak belirlenmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. Piroksikamın mol kesri-pKa yöntemiyle sudaki pKa değerlerinin belirlenmesine ait grafik

4. Sonuç

İlaçların metabolizmadaki davranışlarının ön görülmesi ve rutin analizleri için ilaçların su ortamındaki pKa değerlerinin bilinmesi önemlidir. YPSK tekniği kullanılarak farklı oranlarda su-organik çözücü karışımı içeren ortamlarda maddelerin pKa değerlerinin deneysel olarak belirlenmesi mümkün olmaktadır. Bu deneysel verilerden hareketle ilgili bileşik suda yeteri kadar çözünmese bile çeşitli yaklaşımlarla sudaki pKa değerleri tahmin edilebilmektedir. Çalışmada piroksikam etken maddesi için YPSK tekniği ve mol kesri-pKa yaklaşımı ile elde edilen verilerin, literatürde yer alan benzer ve diğer yöntemlerin verileri ile uyumlu olduğu görülmüştür. Bu veriler piroksikam için analitik prosedürlerin optimizasyonunda kullanılabilceği gibi çeşitli ortamlarda fizikokimyasal davranışı hakkında önemli bilgiler içermektedir.

Kaynakça

- Avdeef, A., Box, K. J., Comer, J. E. A., Gilges, M., Hadley, M., Hibbert, C., Patterson, W. & Tam, K. Y. (1999). PH-metric log P 11. pKa determination of water-insoluble drugs in organic solvent-water mixtures. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 20(4), 631-641. doi:[https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(98\)00235-0](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(98)00235-0).
- Babić, S., Horvat, A. J., Pavlović, D. M., & Kaštelan-Macan, M. (2007). Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(11), 1043-1061. doi:<https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.09.004>.
- Çelebier, M., Nenni, M., Kaplan, O., Akgeyik, E., Kaynak, M. S., & Şahin, S. (2020). Determination of the Physicochemical Properties of Piroxicam. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17(5), 535. doi:<https://doi.org/10.4274/tjps.galenos.2019.82335>
- Demiralay, E. C., Alsancak, G., & Ozkan, S. A. (2009). Determination of pKa values of nonsteroidal antiinflammatory drug-oxicams by RP-HPLC and their analysis in pharmaceutical dosage forms. *Journal of separation science*, 32(17), 2928-2936. doi:<https://doi.org/10.1002/jssc.200900234>.
- Demiralay, E. Ç., Koç, D., Daldal, Y. D., & Çakır, C. (2012). Determination of chromatographic and spectrophotometric dissociation constants of some beta lactam antibiotics. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 71, 139-143. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.06.023>.
- Gwak, H. S., Choi, J. S., & Choi, H. K. (2005). Enhanced bioavailability of piroxicam via salt formation with ethanolamines. *International journal of pharmaceutics*, 297(1-2), 156-161. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.03.016>.
- Ishihama, Y., Nakamura, M., Miwa, T., Kajima, T., & Asakawa, N. (2002). A rapid method for pKa determination of drugs using pressure-assisted capillary electrophoresis with photodiode array detection in drug discovery. *Journal of pharmaceutical sciences*, 91(4), 933-942. doi:<https://doi.org/10.1002/jps.10087>.
- Moldoveanu, S. C., & David, V. (2002). Sample preparation in chromatography: Elsevier.
- Moldoveanu, S. C., & David, V. (2013a). Chapter 1 - Basic Information about HPLC. In S. C. Moldoveanu & V. David (Eds.), *Essentials in Modern HPLC Separations* (pp. 1-51): Elsevier.

- Moldoveanu, S. C., & David, V. (2013b). Chapter 7 - Mobile Phases and Their Properties. In S. C. Moldoveanu & V. David (Eds.), *Essentials in Modern HPLC Separations* (pp. 363-447): Elsevier.
- Rosés, M., Canals, I., Allemann, H., Siigur, K., & Bosch, E. (1996). Retention of Ionizable Compounds on HPLC. 2. Effect of pH, Ionic Strength, and Mobile Phase Composition on the Retention of Weak Acids. *Analytical Chemistry*, 68(23), 4094-4100. doi: <https://doi.org/10.1021/ac960105d>.
- Sezgin, B., Arli, G., & Can, N. Ö. (2021). Simultaneous HPLC-DAD determination of seven intense sweeteners in foodstuffs and pharmaceuticals using a core-shell particle column. *Journal of Food Composition and Analysis*, 97, 103768. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103768>.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2017). *Principles of instrumental analysis*: Cengage learning.
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. (2011). *Introduction to modern liquid chromatography*: John Wiley & Sons.
- Soyseven, M., Kaynak, M. S., Çelebier, M., Aboul-Enein, H. Y., & Arli, G. (2020). Development of a RP-HPLC method for simultaneous determination of reference markers used for in-situ rat intestinal permeability studies. *Journal of Chromatography B*, 1147, 122150. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122150>.
- Starek, M., & Krzek, J. (2009). A review of analytical techniques for determination of oxicams, nimesulide and nabumetone. *Talanta*, 77(3), 925-942. doi: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.09.022>.
- Subirats, X., Rosés, M., & Bosch, E. (2007). On the effect of organic solvent composition on the pH of buffered HPLC mobile phases and the pK_a of analytes - A review. *Separation and Purification Reviews*, 36(3), 231-255. doi: <https://doi.org/10.1080/15422110701539129>.
- Tindall, G. W., & Dolan, J. W. (2003). Mobile-Phase Buffers, Part II-Buffer Selection and Capacity. *LC GC Europe*, 16, 10.