

# Sušenje raspršivanjem kao metoda povećanja topljivosti djelatne tvari

---

**Sokolić, Mario**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:328718>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-21**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Mario Sokolić  
ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Mario Sokolić

SUŠENJE RASPRŠIVANJEM KAO METODA POVEĆANJA TOPLJIVOSTI DJELATNE TVARI

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Gordana Matijašić

Članovi povjerenstva:

Prof. dr. sc. Gordana Matijašić

Prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum

Izv. prof. dr. sc. Nevenka Vrbos

Zagreb, rujan 2019.

*Završni rad izrađen je u Zavodu za mehaničko i toplinsko procesno inženjerstvo Fakulteta  
kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.*

*Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Gordani Matijašić na ukazanoj pomoći, prenesenom znanju te brojnim savjetima prilikom izrade ovog Završnog rada. Također veliko hvala Matiji Gretiću, mag. ing. cheming. na trudu i uloženom vremenu.*

*Hvala Vam puno!*

## SAŽETAK

Topljivost lijekova predstavlja veliki problem u farmaceutskoj industriji zbog nemogućnosti, sporog ili nepotpunog oslobađanja djelatne tvari. Problem predstavlja kristalna struktura djelatne tvari zbog koje dolazi do slabijeg otapanja unutar krvotoka ili želudca. Postoje mnoge metode koje se koriste kako bi se povećala topljivost koje se uglavnom temelje na pripravi amorfnog uzorka iz kristalnog oblika lijeka.

U ovom radu provedeno je sušenje otopina celekoksiba raspršivanjem. Ispitan je utjecaj otapala te promjene protoka zraka za raspršivanje na svojstva konačnih uzoraka te *in vitro* oslobađanje celekoksiba. Uzorci su analizirani razlikovnom pretražnom kalorimetrijom (DSC) i rendgenskom difrakcijom (XRPD). Ispitana je topljivost dobivenih uzoraka. *In vitro* metodom dobiveni su profili oslobađanja celekoksiba koji su uspoređeni izračunom statističkih pokazatelja, faktora sličnosti i faktora razlike.

Rezultati su pokazali da je metodom sušenja raspršivanjem dobivena bolja topljivost celekoksiba i njegovo brže oslobađanje *in vitro*. XRPD difraktogrami ukazuju da sušenjem nije došlo do promjene iz kristalne u amorfnu fazu zbog čega se zaključuje da je povećanje topljivosti posljedica promjene u obliku i raspodjeli veličina čestica. Faktori sličnosti pokazuju statistički značajnu razliku profila oslobađanja.

### ***Ključne riječi:***

Celekoksib, sušenje raspršivanjem, *in vitro* ispitivanje, faktor sličnosti, DSC, XRPD.

## **ABSTRACT**

The solubility of drugs is a major problem in the pharmaceutical industry due to the inability, slow or incomplete release of the active substance. The major problem is the crystalline form of the active substance that causes it to dissolve poorly within the bloodstream or stomach. There are many methods used to increase the solubility based mainly on the preparation of an amorphous sample from the crystalline form of the drug.

Spray drying of celecoxib solutions was performed in this work. The effect of solvents and changes in the flow of atomization air on the properties of the final samples and the *in vitro* release of celecoxib were examined. Samples were analyzed by differential scanning calorimetry (DSC) and X-ray diffraction (XRPD). The solubility of the samples obtained was tested. *In vitro* celecoxib release profiles were obtained and compared by calculating statistical indicators, similarity factor and difference factor.

The results showed that the spray drying method gave better solubility of celecoxib and its faster *in vitro* release. XRPD diffractograms indicate that drying did not change from crystalline to amorphous phase, which leads to the conclusion that the increase in solubility was due to a change in the particle shape and particle size distribution. Similarity factors show a statistically significant difference in the release profiles.

### **Keywords:**

Celecoxib, spray drying, *in vitro* tests, similarity factor, DSC, XRPD.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>2</b>
2.1. Sušenje raspršivanjem .....	2
2.1.1. Vrste atomizera.....	3
2.1.2. Kontakt kapljica i plina za sušenje .....	6
2.1.3. Isparavanje vlage .....	7
2.1.4. Separacija čestica.....	8
2.2. BCS klasifikacija lijekova .....	9
2.3. Topljivost, profili oslobađanja, amorfnu fazu.....	10
2.3.1. Topljivost.....	10
2.3.2. Profili oslobađanja.....	11
2.3.3. Amorfnu fazu.....	12
2.4. <i>In vitro</i> ispitivanje oslobađanja djelatne tvari.....	13
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>16</b>
3.1. Materijali .....	16
3.1.1. Celekoksib .....	16
3.1.2. Priprema otopine za sušenje .....	16
3.1.3. Medij za <i>in vitro</i> ispitivanja.....	17
3.2. Sušenje raspršivanjem .....	17
3.3. Metode karakterizacije .....	18
3.3.1. Razlikovna pretražna kalorimetrija (DSC).....	18
3.3.2. Rendgenska difrakcija praha (XRPD) .....	18
3.4. Ispitivanje <i>in vitro</i> oslobađanja celekoksiba.....	18
3.5. Obrada rezultata.....	21
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>22</b>
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>29</b>
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>31</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>32</b>



# 1. UVOD

Razvojem farmaceutske industrije došlo je do otkrića velikog broja lijekova koji bi u svakodnevnoj upotrebi znatno produljili životni vijek čovjeka. Jedan od problema većine lijekova je slaba topljivost, odnosno slabo otapanje u ljudskom krvotoku. Svakodnevno se razvijaju nove metode kako bi se riješio ovaj problem.

Cilj svake metode je dobiti/sintetizirati spojeve amorfnih struktura. Amorfni za razliku od kristala nemaju uređenu trodimenzionalnu strukturu već su nepravilnog i slučajnog rasporeda što poboljšava njihovu topljivost. Djelatna tvar se u amorfnoj strukturi zadržava pripremom čvrstih disperzija, mješavina amornog lijeka i polimernog nosača. Polimer veže lijek na lanac čime smanjuje njegovu pokretljivost i time mogućnost njegove rekristalizacije.

Sušenje raspršivanjem jedna je od novijih metoda priprema čvrstih disperzija. U korist joj ide to što je učinkovita i ekonomski isplativija u odnosu na druge. To je napredna tehnika kojom se kapljevite smjese prevode u praškaste materijale. Dobra je za sušenje toplinski osjetljivih materijala i ovisno o uvjetima moguće je proizvesti produkt točno određenih fizičkih svojstva.

*In vitro* ispitivanje opuštanja djelatne tvari primjenjuje se u farmaceutskoj industriji kako bi se osigurala kvaliteta proizvoda, naročito krutih oralnih oblika kao što su tablete i kapsule.

Cilj ovog rada je djelatnu tvar otopiti u različitim medijima te provesti postupak sušenja raspršivanjem. Svojstva dobivenih prašaka ispitati različitim metodama karakterizacije: diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC) i rendgenska difrakcija praha (XRPD) te *in vitro* ispitivanje brzine oslobađanja.

## 2. TEORIJSKI DIO

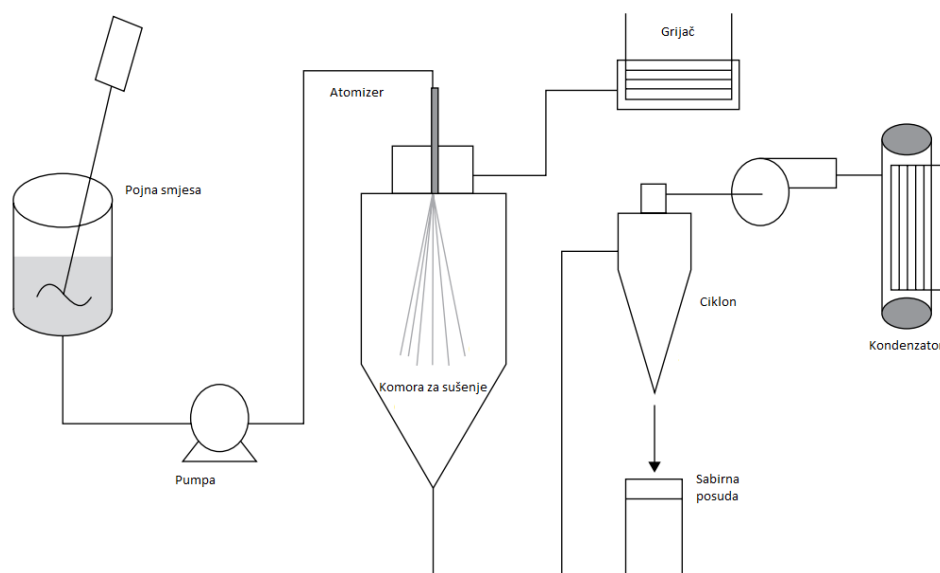
### 2.1. Sušenje raspršivanjem

Sušenje raspršivanjem je proces prevođenja materijala iz otopine u kruto stanje uvođenjem te otopine u struju vrućeg plina. Temeljna razlika između ostalih tehnika sušenja i sušenja raspršivanjem je ta što se kod ovog načina mogu u jednom koraku osušiti otopine, emulzije ili suspenzije. Tehnologija je registrirana i patentirana 1872. u SAD-u, a prve primjene doživjela je u Drugom svjetskom ratu kad se koristila u proizvodnji mlijeka u prahu.

Osnovni dijelovi sušionika su:

- Raspršivač (atomizer) – odvija se raspršivanje pojne smjese u kapljice
- Komora za sušenje – mjesto gdje se kapljice suše vrućim zrakom
- Pumpa – uvodi pojnu smjesu u atomizer
- Grijač – zagrijava plin koji se uvodi u komoru za sušenje
- Separator – odvajaju se osušene čestice od plina (najčešće ciklon)

Sušionik radi na konvekcijskom principu sušenja plinom. Najčešći plin za sušenje je zrak, ali kada se radi o nekom organskom otapalu tada se često koristi dušik. Proces se odvija na principu da se otopina pomoću pumpe dovodi do vrha kolone za sušenje na kojem se nalazi atomizer. Zagrijani plin se uvodi na vrhu kolone. Kapljice nastale atomizacijom suše se u struji vrućeg plina gdje kapljevina isparava i time snižava temperaturu u koloni. Osušene čestice padaju na dno kolone gdje ih zrak povlači u ciklon. Ciklon separira čestice od plina, pri čemu se čestice odvajaju na dnu ciklona u sabirnu posudu, a plin na vrhu ciklona. Dio čestica koji ciklon ne može separirati ostaje u struji plina i filtrira se na filteru. Ukoliko je riječ o otvorenom procesu, čisti plin se ispušta u atmosferu, a ako se radi o zatvorenom procesu, zrak se vraća nazad u grijač. Shematski prikaz procesa prikazan je na slici 1. [1]

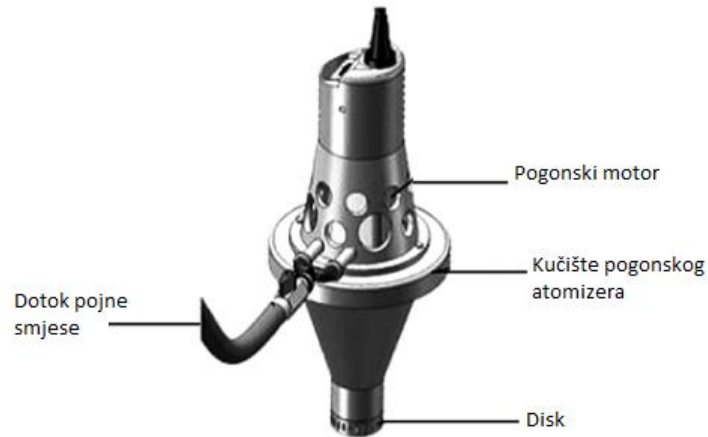


*Slika 1. Shematski prikaz sušenja raspršivanjem*

### 2.1.1. Vrste atomizera

Najvažnija operacija u procesu koja uvjetuje oblik, veličinu i raspodjelu veličina kapljica, a na kraju i veličinu suhih čestica je atomizacija. Otopina se dovodi pomoću pumpe u atomizer. O atomizerima ovisi kolika će biti potrošnja energije, jer atomizeri koriste energiju da bi raspršili otopinu u kapljice, a može biti centrifugalna, tlačna, kinetička ili vibracijska. Time razlikujemo rotacijske atomizere, tlačne atomizere, atomizere s dva fluida i ultrazvučne atomizere. [1]

Rotacijski atomizer (slika 2) centrifugalno ubrzava pojnu smjesu na atomizacijskom disku prije nego što se rasprši u zagrijanom plinu. Morfologija i stupanj atomizacije ovise o dizajnu diska, protoku pojne smjese, brzini okretanja diska i svojstvima otopine. Ovi atomizeri se ne začepljuju. Dolazi do uske raspodjele čestica, a pogodni su za atomizaciju abrazivnih materijala. Mane su u visokim instalacijskim troškovima te visokim troškovima održavanja i potrebi za velikim komorama. [1]



*Slika 2.* Rotacijski atomizer

Tlačni atomizer (slika 3) temelji se na ispuštanju otopine pod pritiskom kroz sitni otvor mlaznice. Tlačna energija pretvara se u kinetičku i odvodi otopinu kroz otvor mlaznice pod visokim brzinama pri kojima se raspršuju u sitne kapljice. Promjer kapljica izravno je proporcionalan brzini dovoda i viskoznosti, a obrnuto proporcionalan s tlakom atomizacije. Korištenjem tlačne mlaznice dobije se produkt visoke gustoće, uže raspodjele čestica i s izvrsnim reološkim svojstvima. Najveći nedostaci su nemogućnost namještanja veličine čestica tijekom sušenja te začepljenje otvora zbog erozije i korozije na otvoru atomizera. [1]

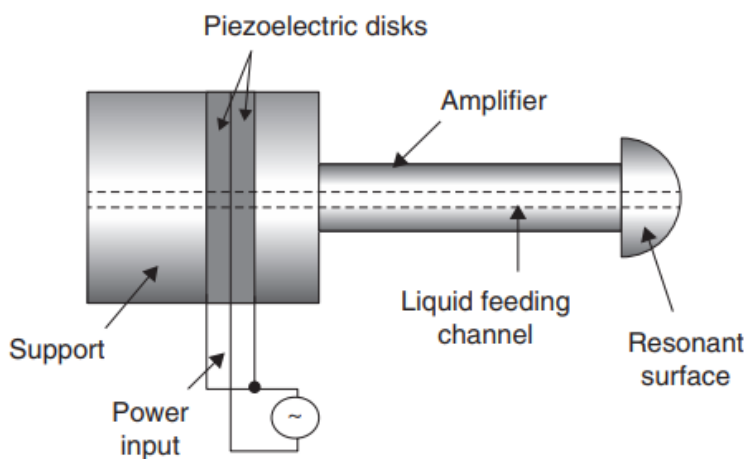


*Slika 3.* Tlačna mlaznica

Atomizer s dva fluida (slika 4) temelji se na Weberovim nalazima. Ima svojstvo raspada otopine na kapljice pod snažnim udarom fluida obično izvan dizne, ali ima i drugačijih izvedba. Ovi atomizeri pogodni su za sušenje toplinski osjetljivih materijala i i viskoznih otopina. Nemaju pomičnih dijelova, jednostavne su izvedbe, jednostavni su za čišćenje te je moguće osigurati sterilne uvjete. Nedostatci su nemogućnost regulacije i kontrole procesa; potreba za stlačenim fluidom povećava operativne troškove i postoji mogućnost začepljenja dizne. [1]



Slika 4. (a) Mlaznica atomizera s dva fluida, (b) raspršivanje iz mlaznice s dva fluida

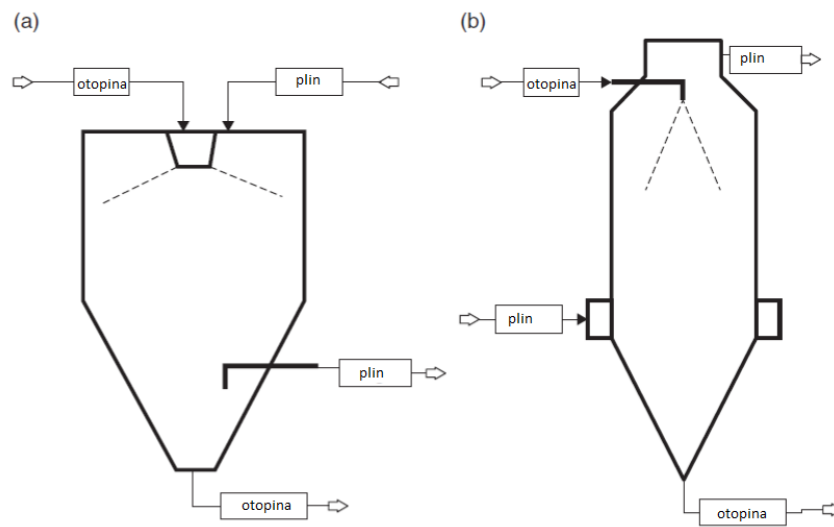


Slika 5. Shema Ultrazvučnog atomizera

Ultrazvučni atomizer (slika 5) temelji se na principu elektromehaničkog uređaja koji korištenjem visokih frekvencija vibrira. Ova vrsta atomizera se najrjeđe koristi. Radi pri malim tlakovima pri čemu je pogodan za korozivne i abrazivne materijale. [1]

### 2.1.2. Kontakt kapljica i plina za sušenje

Nakon atomizacije pojne smjese u kapljice, sljedeći korak je osušiti otapalo iz kapljica dovođenjem tih kapljica u kontakt s vrućim plinom. Najčešće do kontakta dolazi u komori za sušenje i plin se može dovoditi istostrujno ili protustrujno (slika 6). [1]



Slika 6. Tipovi sušionika: a) istostrujni kontakt; b) protustrujni kontakt

Tijekom istostrujnog sušenja, atomizirane kapljice ulaze u komoru za sušenje u kontaktu s vrućim plinom. Iako plin na ulazu u komoru ima najvišu temperaturu, materijal sadrži najviše vlage pa je toplina predana kapljicama zapravo latentna toplina isparavanja, a temperatura materijala ostaje niska. Pogodan je za temperaturno osjetljive materijale. Vrijeme kontakta vrućeg zraka s kapljicama raspršivača iznosi samo nekoliko sekundi tijekom kojih se postiže sušenje, a temperatura zraka opada. [1]

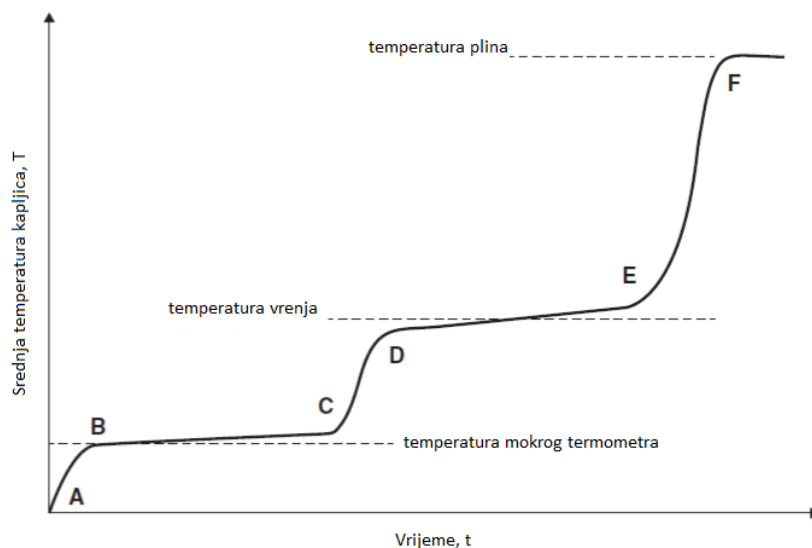
Suprotno tome je protustrujno sušenje gdje se kapljice i plin za sušenje uvode na suprotnim krajevima komore za sušenje. Kapljice ulaze na vrhu komore, a plin za sušenje na dnu komore. Kod ove vrste kontaktiranja temperatura materijala na izlazu viša je nego plina nosioca na izlazu i približno je jednaka temperaturi zraka na ulazu. Ovaj tip nije prikladan za toplinski osjetljive materijale. [1]

Postoji još i kombinirana izvedba istosrjnog i protustrujnog toka. Plin za sušenje ulazi na vrhu komore, a kapljice na dnu komore. Ova vrsta koristi se za sušenje slobodno tecivih prašaka. Nedostatak ovakve izvedbe je viša temperatura čestica na izlazu. [1]

### 2.1.3. Isparavanje vlage

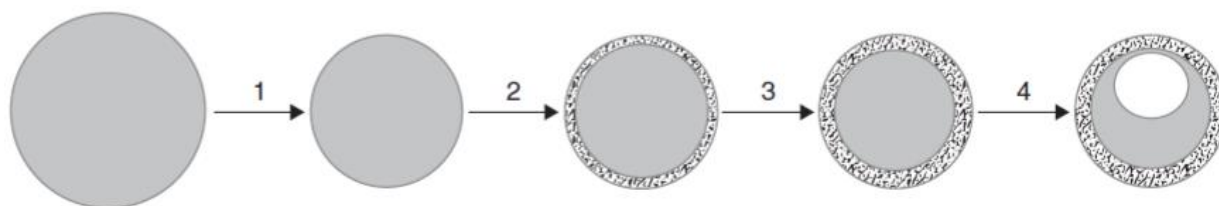
Najvažniji dio procesa povezan s morfologijom čestica je isparavanje vlage. Isparavanje vlage može se prikazati u dva stupnja:

- (i) Period konstantne brzine sušenja
- (ii) Period padajuće brzine



Slika 7. Kinetička krivulja sušenja ( $T, t$ )

U početku, kada je kapljica izložena vrućem plinu, dolazi do brzog isparavanja. Za vrijeme ove izloženosti, kapljica se zagrijava od početne temperature ( $T_0$ ) do temperature ravnotežnog isparavanja ( $T_{eq}$ ) (na slici 7, AB). Nakon toga dolazi period konstantne brzine sušenja. Površina kapljice u ovoj fazi ostaje zasićena vlagom, a temperatura je jednaka temperaturi mokrog termometra. Taj period traje dok god je brzina kojom se vlaga dovodi iz unutrašnjosti do površine materijala dovoljno velika da je cijela prekrivena vlagom. Vanjski uvjeti kontroliraju brzinu sušenja, to jest otpor prijenosu topline, količine gibanja i tvari na strani zrak. Daljnjim isparavanjem, smanjuje se koncentracija otapala na površini kapljice i nastaje ovojnica. Zbog nezasićenosti kapljice otapalom, dolazi do kretanja otapala iz unutrašnjosti prema površini (difuzijski ili kapilarno) i to postaje kontrolirajući mehanizam kinetike sušenja (slika 8). Sušenje se ovdje odvija padajućom brzinom i traje do postizanja ravnoteže. [1]

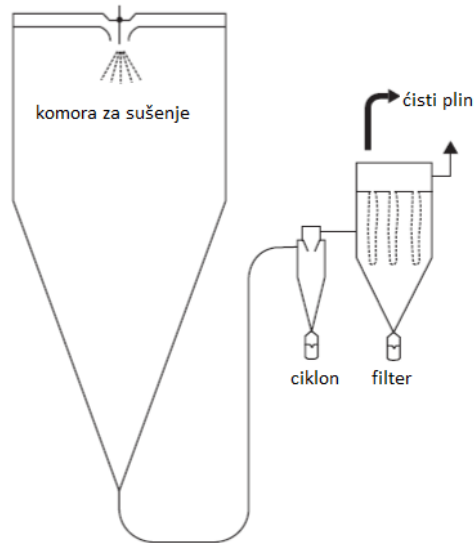


Slika 8. Sušenje kapljice

#### 2.1.4. Separacija čestica

Završna faza sušenja je odvajanje suhih čestica od struje zagrijanog plina. U tu svrhu najčešće se koriste cikloni (slika 9). Oni su sastavljeni od gornjeg, cilindričnog i donjeg, konusnog dijela. Struja plina i čestica tangencijalno ulazi u ciklon gdje se vrtložno giba duž konusnog dijela. Čestice su pod djelovanjem centrifugalne sile odvajaju od plina i prikupljaju u sabirnu posudu. Plin se odvodi prema filteru gdje se nakupljaju čestice koje ciklon nije u mogućnosti separirati, a potpuno čist plin se ispušta u atmosferu ili natrag u atomizer ovisno o izvedbi sušionika. [1]





Slika 9. Shema procesa odvajanja suhih čestica iz sušionika

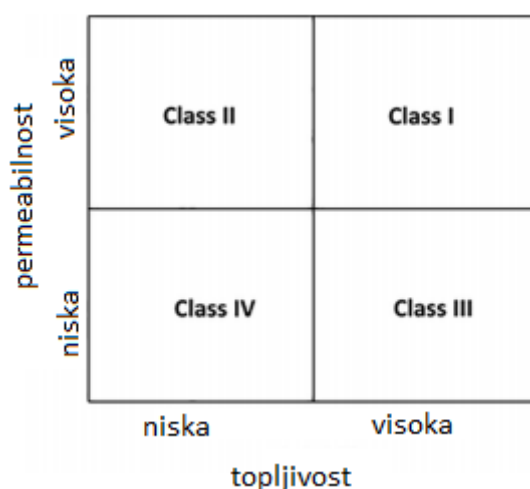
## 2.2. BCS klasifikacija lijekova

BSC (engl. *Biopharmaceutics Classification System*) (slika 10) je znanstveni okvir u kojem su razvrstane ljekovite tvari na temelju njihove topljivosti u vodi i crijevnoj permeabilnosti. Prema ovom sustavu ljekovite tvari mogu se svrstati u četiri skupine:

1. I. skupina – visoke topljivosti i visoke permeabilnosti
2. II. skupina – slabe topljivosti i visoke permeabilnosti
3. III. skupina – visoke topljivosti i slabe permeabilnosti
4. IV. skupina – slabe topljivosti i slabe permeabilnosti

Djelatne tvari I. skupine su dobro topljive i dobro permeabilne, vrlo brzo se i kvantitativno otapaju i apsorbiraju preko barijera gastrointestinalnog sustava. Djelatne tvari II. skupine imaju slabu topljivost u tekućinama gastrointestinalnog sustava, ali dobro permeiraju preko fizioloških barijera gastrointestinalnog sustava. Djelatne tvari III. skupine dobro su topljive, ali loše permeabilne preko barijera gastrointestinalnog traka te zbog toga postoji opasnost od izlučivanja iz organizma bez farmakološkog učinka. Djelatne tvari IV. skupine su slabo topljive i slabo permeabilne stoga predstavljaju najveći problem pri razvoju formulacija.[2]

Od predstavljanja BCS-a 1995. učinjena su značajna poboljšanja u razvoju farmaceutskih oblika lijekova. Prihvaćen je od regulatornih tijela; Američke agencije za hranu i lijekove (FDA), Europske agencija za lijekove (EMA) i Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) u postavljanju bioekvivalencije većine odobrenih oralnih pripravaka trenutnog oslobađanja djelatne tvari. *In vitro* metodom moguće je pouzdano procijeniti bioekvivalenciju većine odobrenih oralnih pripravaka trenutnog oslobađanja djelatne tvari naspram dugotrajnih i skupih kinetičkih ispitivanja. S vremenom je WHO proširila primjenu na određenje djelatne tvari II. skupine, dok EMA i WHO odobravaju primjenu i za neke djelatne tvari III. skupine.[3]



Slika 10. BCS klasifikacija djelatnih tvari [4]

## 2.3. Topljivost, profili oslobađanja, amorfna faza

### 2.3.1. Topljivost

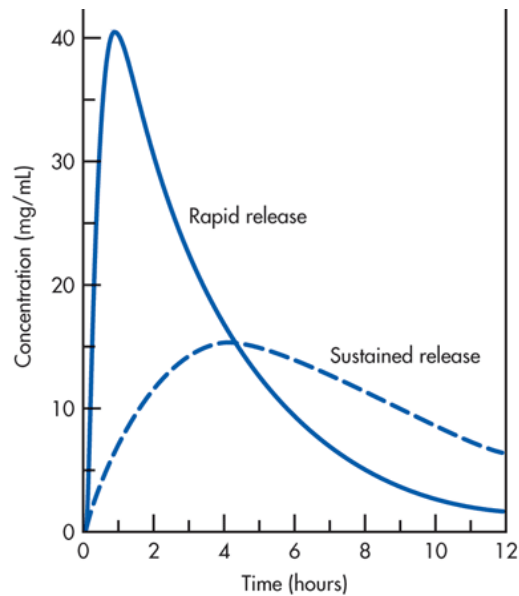
Topljivost je kapacitet tvari koji se može otopiti u čistom otapalu. Odnosi se na maksimalnu količinu otopljene tvari koju čisto otapalo može držati u otopini pri određenim uvjetima okoline. To je termodinamički proces u kojem sustav teži postići najnižu potencijalnu energiju (termodinamički stabilniji). Jednom kad se postigne sposobnost otapala za otapanje bilo koje otopljene tvari, daljnje dodavanje otopljene tvari rezultirat će taloženjem te tvari na dnu spremnika. Topljivost govori samo o krajnjem stanju sustava, ne i koliko je vremenski potrebno da se postigne

ravnotežno stanje. Topljivost tvari može se izraziti općenito (topljiv, slabo topljiv, netopljiv) ili precizno (g/L, g/100g, g%). Parametri koji utječu na topljivost su:

1. Priroda tvari (intermolekularne interakcije) – kristali, amorfi.
2. Polarnost otopine i otapala – polarne otopine bit će bolje topljive u polarnom otapalu i obratno.
3. Termodinamika otapanja – ako je Gibbsova energija negativna, topljivost raste.
4. Temperatura – s porastom temperature uglavnom raste topljivost.
5. Ionizacija otopljene tvari i otapala, pH – pH može u velikoj mjeri utjecati na topljivost ioniziranih otopina. Kiseli lijekovi su manje topljivi u kiselinskim otopinama zbog toga što je veći dio lijeka u čvrstom obliku koji je manje sposoban za interakciju s otapalom (vodom) od ioniziranog oblika [5]

### **2.3.2. Profili oslobađanja**

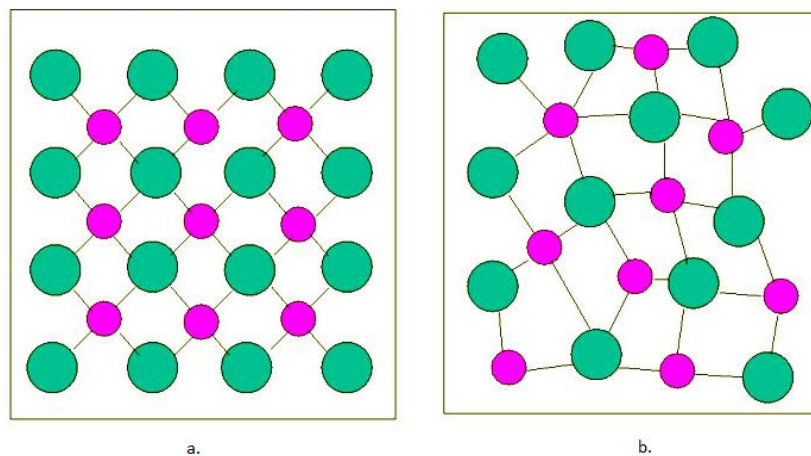
Profile oslobađanja djelatne tvari moguće je opisati na nekoliko načina: trenutno, odgođeno, produženo, modificirano, kontrolirano ili impulsno oslobađanje (slika 11). Trenutno oslobađanje je oslobađanje u kojem se djelatna tvar otapa u što kraćem razdoblju bez namjere za produljenjem ili odlaganjem djelatne tvari. Kod odgođenog oslobađanja dolazi do kontroliranog oslobađanja s ciljem postizanja dostupnosti lijeka tijekom duljeg vremenskog razdoblja uz oslobađanje u točno određenom dijelu probavnog traka. Produženo oslobađanje je oslobađanje tijekom duljeg vremenskog razdoblja. Modificirano oslobađanje je kombinacija odgođenog i produženog oslobađanja, a kontrolirano oslobađanje kombinacija produženog i impulsnog oslobađanja. Oslobađanje djelatne tvari u točno određenim vremenskim intervalima nakon konzumiranja lijeka naziva se impulsno oslobađanje. [6]



Slika 11. Tipovi oslobađanja djelatne tvari [6]

### 2.3.3. Amorfna faza

Amorf (grč. *Amorphos*) u prijevodu znači bez oblika. Dok kristali imaju periodično uređenu trodimenzionalnu strukturu dugog doseg, amorfni to nemaju (slika 12). Njihove molekule nalaze se u nasumičnom položaju sličnom kao kod tekućina. Raspored molekula im nije u potpunosti uređen kao u kristalnom stanju niti potpuno nasumičan kao u plinovitom stanju. Uređenost im je kratkog doseg, a karakteriziraju ih područja različitih gustoća i rezidualna kristaličnost. [7]



Slika 12. Vrste struktura: a) kristalna; b) amorfna struktura [8]

Svojstva amorfne tvari dosta se razlikuju od svojih kristalnih oblika. U farmaceutskoj industriji amorfni se lijekovi najčešće koriste pri izradi čvrstih disperzija lijeka u polimeru radi boljeg postizanja kontroliranog oslobađanja lijeka, poboljšanja topljivosti lijeka i u liofilizatima. Najznačajnija prednost amorfa u odnosu na kristalnu strukturu je njegova bolja topljivost, a uz to i bolja bioraspoloživost. [9]

Amorfe zbog svoje veće kemijske reaktivnosti dosta često prati sposobnost spontanog prijelaza u kristalno stanje što ugrožava bioraspoloživost lijeka tijekom obrade i skladištenja. [7] Zbog svoje povišene unutarnje energije imaju drugačija termodinamička svojstva od svog kristalnog oblika kao što su topljivost, tlak pare, adsorpcija pare te mehanička svojstva i veću kemijsku reaktivnost. [9]

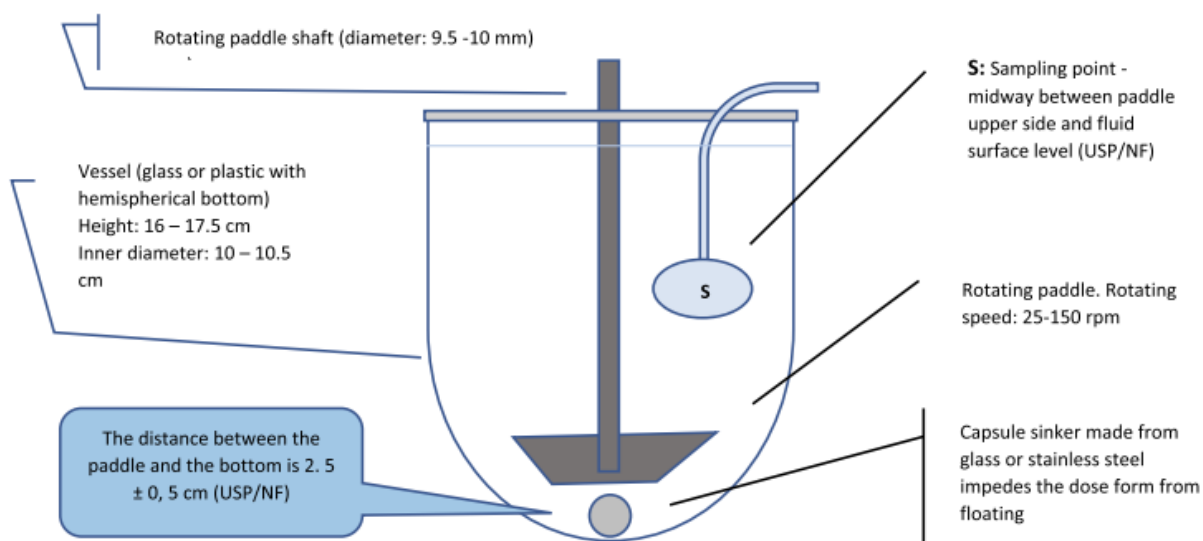
S obzirom na temperaturnu ovisnost aktivacijske energije amorfi se dijele na jake i slabe amorfe. Jaki amorfi imaju malu promjenu toplinskog kapaciteta na temperaturi staklišta pa se ta promjena uglavnom ne može otkriti rutinskim kalorimetrijskim metodama. Slabi amorfi imaju izraženiju temperaturnu ovisnost molekulskog gibanja u blizini temperaturnog staklišta i relativno veliku promjenu toplinskog kapaciteta pri temperaturi staklastog prijelaza. [9]

Kemijska stabilnost amorfne faze razlikuje se od kemijske stabilnosti kristala. Reaktivne molekule u amorfim tvarima imaju više gibljivosti i slobode da ostvare degradacijsku reakciju nego kristalne tvari te je za veliki broj lijekova potvrđena ta teorija. [9]

## **2.4. *In vitro* ispitivanje oslobađanja djelatne tvari**

Ispitivanje oslobađanja djelatne tvari potrebno je za sve čvrste oralne oblike doziranja i koristi se u svim fazama razvoja za ispitivanje oslobađanja i stabilnosti proizvoda. To je ključni analitički test koji se koristi za otkrivanje fizičkih promjena djelatne farmaceutske tvari (API) u formuliranom proizvodu. *In vitro* metoda vodi do optimizacije oslobađanja lijeka iz formulacije. U posljednjih 50 godina, ispitivanje otapanja također je korišteno u kontroli kvalitete te procesima istraživanja i razvoja u svrhu otkrivanja utjecaja kritičnih proizvodnih parametara u komparativnim studijima za *in vitro*–*in vivo* korelaciju (IVIVC). [10]

Smjernice FDA-a o ispitivanju otapanja krutih oralnih oblika doziranja s neposrednim opuštanjem uključuju i uporabu smjernica biofarmaceutskog klasifikacijskog sustava (BCS) za ispitivanje biorelevantnog testa otapanja koji se temelji na topljivosti i permeabilnosti API-a. Prema BCS smjernicama, ispitivanje in vitro otapanja može biti koristan alat za predviđanje u in vivo učinkovitosti lijekova i u potencijalnom smanjenju broja potrebnih ispitivanja bioraspodjelivosti / bioekvivalencije. Iako se široko koristi u farmaceutskoj i biotehnološkoj industriji, osnove testa otapanja često nisu dobro shvaćene. Test mora biti robusan i ponovljiv uz dobro označene promijene na produktu. [11]



Slika 13. Shema USP aparatura 2 [4]

Da bi većina oblika doziranja bila djelotvorna, API se treba apsorbirati u sistematsku cirkulaciju kako bi sigurno bio dostavljen na mjesto aktivacije. Taj proces pridonosi bioraspodjelivosti lijeka i uključuje dva koraka: otapanje i apsorpciju (ili permeabilnost). Otapanje je postupak ekstrakcije API-ja iz dozirnog čvrstog stanja matrice unutar gastrointestinalnog traka, a apsorpcija je proces transporta ljekovite tvari uz gastrointestinalnog lumena u sistemsku cirkulaciju. [11]

Korištena specifična tehnika otapanja mora biti dobro određena karakteristikama oblika doziranja i predviđenim načinom primjene. Za provođenje industrijski standardnog testa otapanja, propisanih od Američke farmakopeje (engl. *United States Pharmacopoeia*, USP), koriste se određene

aparature. USP aparatura 1 (košara) i USP aparatura 2 (lopatica) (slika 13). Tablete s trenutnim, modificiranim ili produženim opuštanjem testiraju se u klasičnoj kupelji sa lopaticama (USP 2). Za plutajuće kapsule i tablete obično se koristi USP 1. Ostale tehnike i oprema uključuju USP 3 (pomoćni cilindar), USP 4 (protočna ćelija), USP 5 (lopatica preko diska), USP 6 (cilindar) i USP 7 (pomoćni držači). [12]

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Celekoksib

Celekoksib (CLX) je nesteroidni protuupalni lijek (engl. *nonsteroidal anti-inflammatory drug* – NSAID) koji se koristi za liječenje akutne boli poput osteoartritisa, reumatoidnog artritisa i dismenoreje. Slabe je topljivosti u vodi (1 – 3 µg/ml) što ograničava njegovu oralnu bioraspodjivost na oko 30 %. Prema BCS-u svrstan je u kategoriju II. skupine (slabo topljiv u vodi i visoke probavne permeabilnosti). Zbog svoje je kristalne igličaste strukture loših farmaceutskih svojstava, osobito loše protočnosti i nepovoljne stlačivosti. [13]

##### 3.1.2. Priprema otopine za sušenje

Prije provođenja eksperimenta pripravljene su dvije vrste otopina za sušenje. Prva otopina sadržavala je 1 g celekoksiba otopljen u 150 ml etanola uz miješanje pomoću magnetne mješalice. Kad je smjesa bila dobro homogenizirana, u nju je dodano 100 ml destilirane vode. Druga vrsta otopine sadržavala je 1 g celekoksiba otopljenog u 100 ml acetona uz miješanje pomoću magnetne mješalice. Također nakon otapanja dodano joj je 125 ml vode. Napravljene su četiri otopine, po dvije od svake vrste. Tablica 1 prikazuje sastave otopina.

Tablica 1. Sastavi otopina za sušenje

Naziv uzorka	Celekoksib /g	Etanol /ml	Aceton /ml	Voda /ml
SD1	1,002	150	/	100
SD2	0,999	/	100	125
SD3	1,010	150	/	100
SD4	1,003	/	100	125



### 3.1.3. Medij za *in vitro* ispitivanja

Za *in vitro* ispitivanje pripravljen je medij od otopljenog natrijevog fosfata i otopljenog natrijevog lauril sulfata (SLS). Natrijev fosfat mase 6,5576 g otopljen je u 0,5 l destilirane vode uz miješanje pomoću magnetne mješalice, dok je natrijev lauril sulfat mase 10,0034 g otopljen u 200 ml destilirane vode također uz miješanje pomoću magnetne mješalice. Objе otopine pomiješane su u tivkici od 1000 ml te napunjene destiliranom vodom do oznake.

### 3.2. Sušenje raspršivanjem

Sušenje raspršivanjem provodilo se u laboratorijskom sušioniku Mini Spray Dryer B-290 (BüchiLabortechnik AG), prikazanom na slici 14.



Slika 14. Sušionik s raspršivanjem B-290, BüchiLabortechnik AG

Otopine različitih sastava (tablica 1) sušene su pri procesnim uvjetima danim u tablici 2.

Tablica 2. Procesni uvjeti u metodi sušenja raspršivanjem

Uzorak	SD1	SD2	SD3	SD4
Promjer dizne, mm	1,4			
Temperatura ulaza, °C	105			
Temperatura izlaza, °C	50		51	
Protok zraka za raspršivanje, m <sup>3</sup> s <sup>-1</sup>	1,9x10 <sup>-4</sup>		4,8x10 <sup>-4</sup>	
Protok otopine, m <sup>3</sup> s <sup>-1</sup>	7,5x10 <sup>-8</sup>			

### 3.3. Metode karakterizacije

#### 3.3.1. Razlikovna pretražna kalorimetrija (DSC)

Toplinska svojstva Soluplusa, celekoksiba, PEG-a i njihovih mješavina ispitana su tehnikom razlikovne pretražne kalorimetrije (engl. *Differential Scanning Calorimetry* – DSC), na uređaju *TA Instruments Discovery DSC*. Ispitivanja su provedena u inertnoj struji dušika protoka 50 mL min<sup>-1</sup>, zagrijavanjem u intervalu od 25 do 300 °C brzinom 10 °C min<sup>-1</sup>.

#### 3.3.2. Rendgenska difrakcija praha (XRPD)

Analiza rendgenske difrakcije praška (XRPD) provedena je pri sobnoj temperaturi korištenjem uređaja Malvern X'Pert Pro (Malvern Panalytical Ltd., Velika Britanija). Difraktometar koristi zračenje iz Cu anode ( $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ ) (uvjeti: 40 kV i 40 mA, X'celerator-ove detekcijska cijev). Rendgenski difraktogrami su snimljeni u području od 5 do 35° 2 $\theta$  pri koraku skeniranja od 0,02 ° i vremenu po koraku od 0,6 s.

### 3.4. Ispitivanje *in vitro* oslobađanja celekoksiba

Brzina oslobađanja celekoksiba ispitana je *in vitro* metodom, a korišten je uređaj na slici 15 (RC-6D, Zhengzhou Nanbei Instrument).

Prema farmakopeji uređaj spada u kategoriju aparature 2. [14] Temperatura medija podešena je na  $37 \pm 0,5 \text{ °C}$ , a za miješanje su korištene lopatice promjera 74 mm s brojem okretaja 50 o/min.

Uzorkovanje je provedeno u vremenima od 10, 20, 30, 45 i 60 minuta. *In vitro* ispitivanja provedena su sa  $100,0 \pm 0,5$  mg uzoraka SD1, SD3 i SD4. Zbog vrlo malog iskorištenja nije skupljena dovoljna količina uzorka SD2 za *in vitro* ispitivanja.



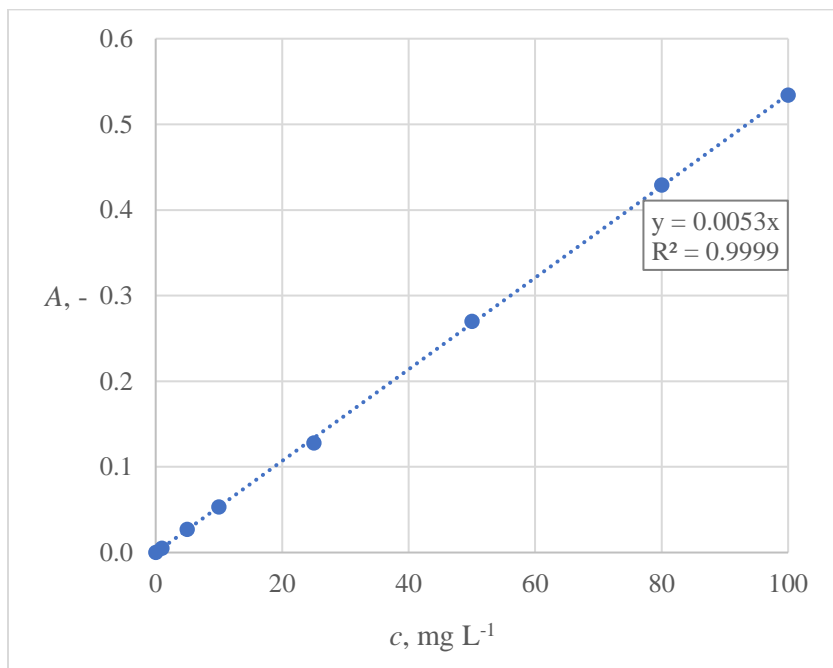
Slika 15. RC-6D, Zhengzhou Nanbei Instrument

Uzorci su filtrirani pomoću filtra Chromafil Xtra H-PTFE-45/25 veličine pora od  $0,45 \mu\text{m}$  i analizirani na UV/Vis spektrofotometru Shimadzu UV-1280 (slika 16) pri valnoj duljini 254 nm što odgovara maksimumu apsorpcije celekoksiba u ispitivanom mediju. Za analizu je korištena protočna kiveta od kvarca.



Slika 16. UV/Vis spektrofotometru Shimadzu UV-1280

Za određivanje umjernog pravca pripremljene su standardne otopine celekoksiba u ispitivanom mediju koncentracije 1, 5, 10, 30, 50, 80 i 100 ppm. Na temelju umjernog pravca (slika 17) moguće je odrediti koncentraciju otpuštenog celekoksiba iz izmjerene apsorbancije.



Slika 17. Umjerni pravac za celekoksib u ispitivanom mediju

### 3.5. Obrada rezultata

Analiza profila oslobađanja provedena je u dodatku za Microsoft Excel, DDSolver. [15] Tri su metode pristupa analizi kinetike oslobađanja sadržane u DDSolver-u: statističke metode, metode ovisne o modelu i metode neovisne o modelu. U metode neovisne o modelima spadaju tzv. omjer-testovi i testovi u kojima se provodi usporedba parova podataka. Usporedba parova podataka uključuje, pak, Rescignov indeks te Moore-Flannerove indekse, odnosno faktore sličnosti i razlike.

#### *Faktor sličnosti ( $f_1$ ) i faktor razlike ( $f_2$ )*

Za određivanje ovih faktora, prvo se odrede profili oslobađanja referentnog ( $R$ ) i ispitivanog uzorka ( $T$ ), u tri do četiri ili više vremenskih točaka. Općenito, vrijednosti  $f_1$  do 15 % (0 – 15) i  $f_2$  veće od 50 % (50 – 100) pokazuju ekvivalentnost između dva profila. [2, 16]

Računaju se po formulama:

$$f_1 = \left\{ \frac{\left[ \sum_{t=1}^n (R_t - T_t) \right]}{\sum_{t=1}^n R_t} \right\} \cdot 100 \quad (1)$$

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[ 1 + \left( \frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \cdot 100 \right\} \quad (2)$$

## 4. REZULTATI

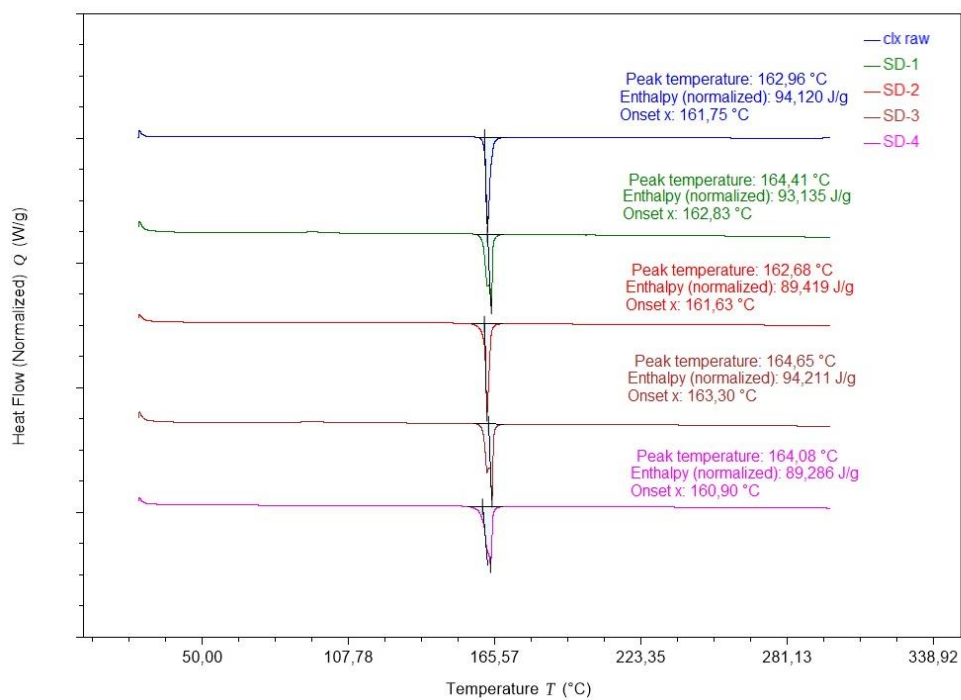
U ovom poglavlju prikazani su rezultati istraživanja u kojima su otopine celekoksiba sušene u sušioniku s raspršivanjem.

U tablici 3 prikazano je iskorištenje procesa. Na slici 18 dani su DSC dijagrami za čisti CLX i uzorke dobivene sušenjem raspršivanjem, dok su na slikama 19 – 22 prikazane usporedbe XRPD difraktograma čistog CLX-a i uzoraka dobivenih sušenjem raspršivanjem. U tablici 4 prikazane su topljivosti uzoraka. Slike 23 – 27 prikazuju profile oslobađanja čistog celekoksiba i uzoraka dobivenih sušenjem raspršivanjem.

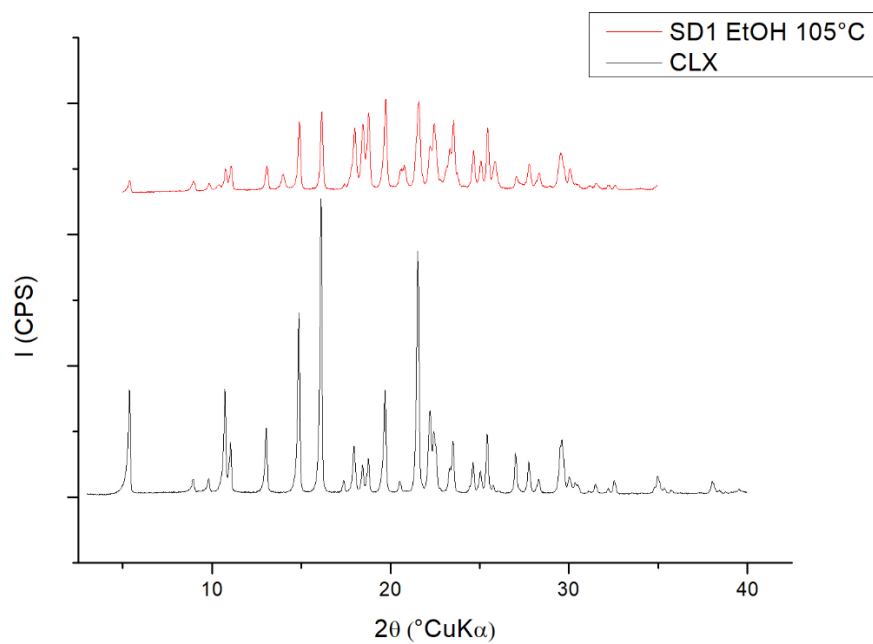
U tablici 5 prikazani su faktori razlike ( $f_1$ ) i faktori sličnosti ( $f_2$ ) između referentnog uzorka CLX i sušenih uzoraka SD.

Tablica 3. Iskorištenje dobiveno sušenjem raspršivanjem

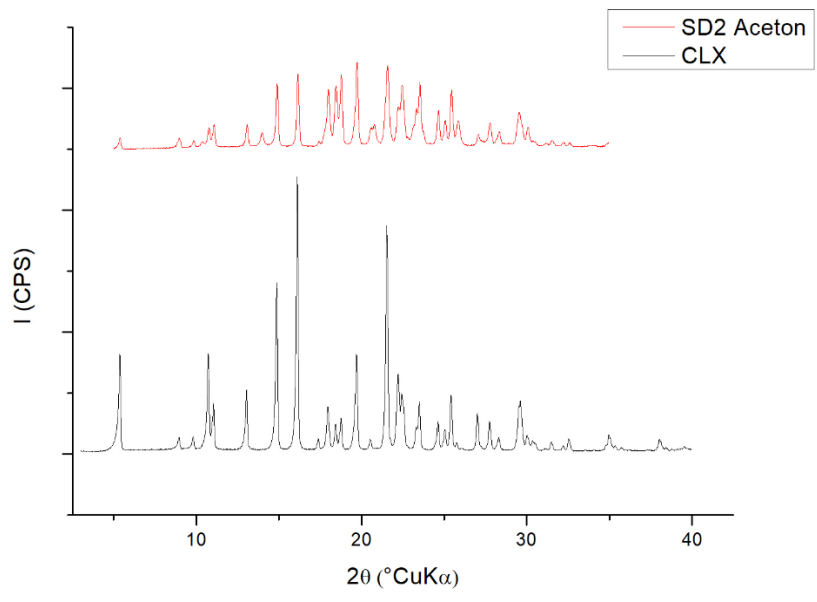
Uzorak	$m_{\text{prije sušenja}} / \text{g}$	$m_{\text{poslije sušenja}} / \text{g}$	Iskorištenje /%
SD1	1,002	0,412	41,1
SD2	0,999	0,135	13,5
SD3	1,010	0,444	44,0
SD4	1,003	0,423	42,2



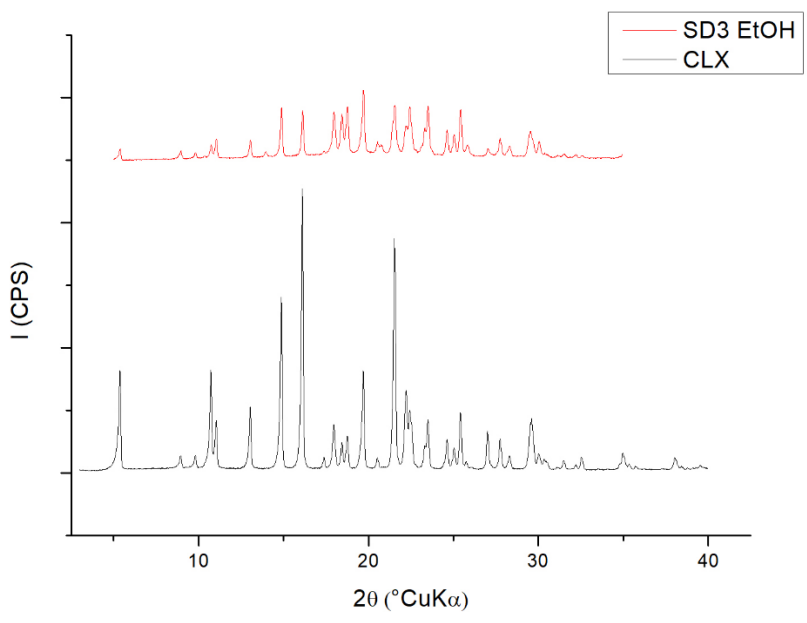
Slika 18. DSC dijagrami za čisti CLX i uzorke dobivene sušenjem raspršivanjem



Slika 19. XRPD difraktogrami za CLX i SD1

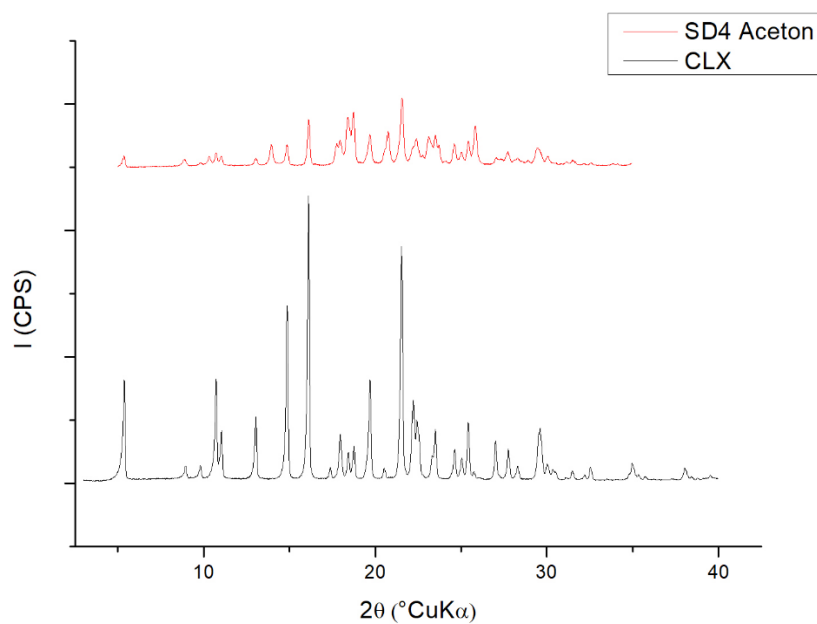


Slika 20. XRPD difraktogrami za CLX i SD2



Slika 21. XRPD difraktogrami za CLX i SD3

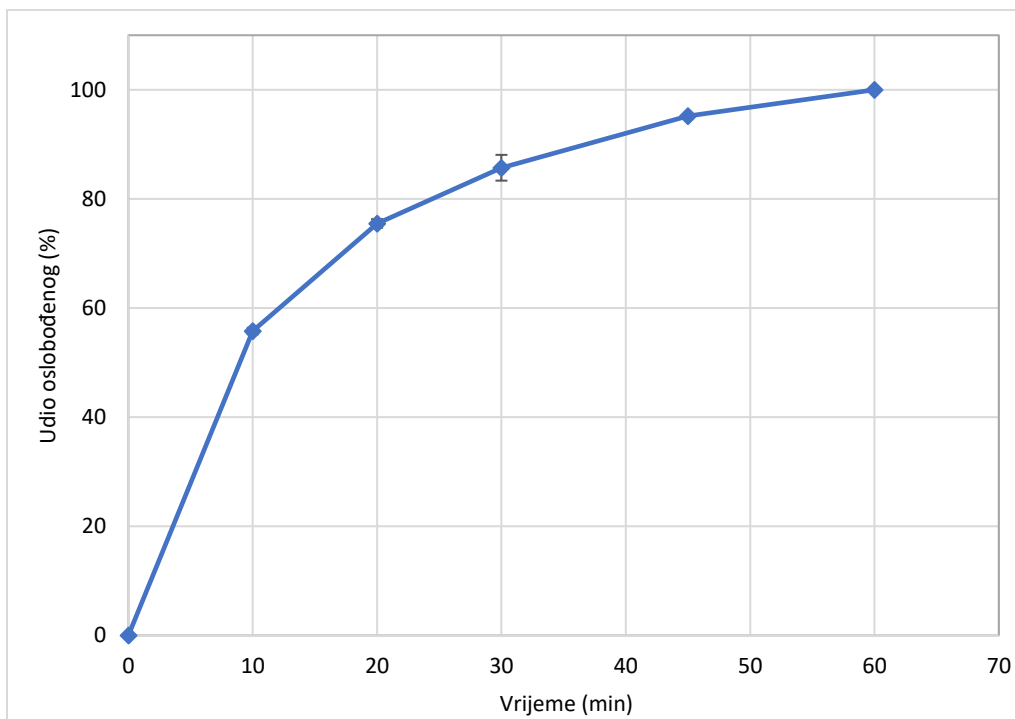




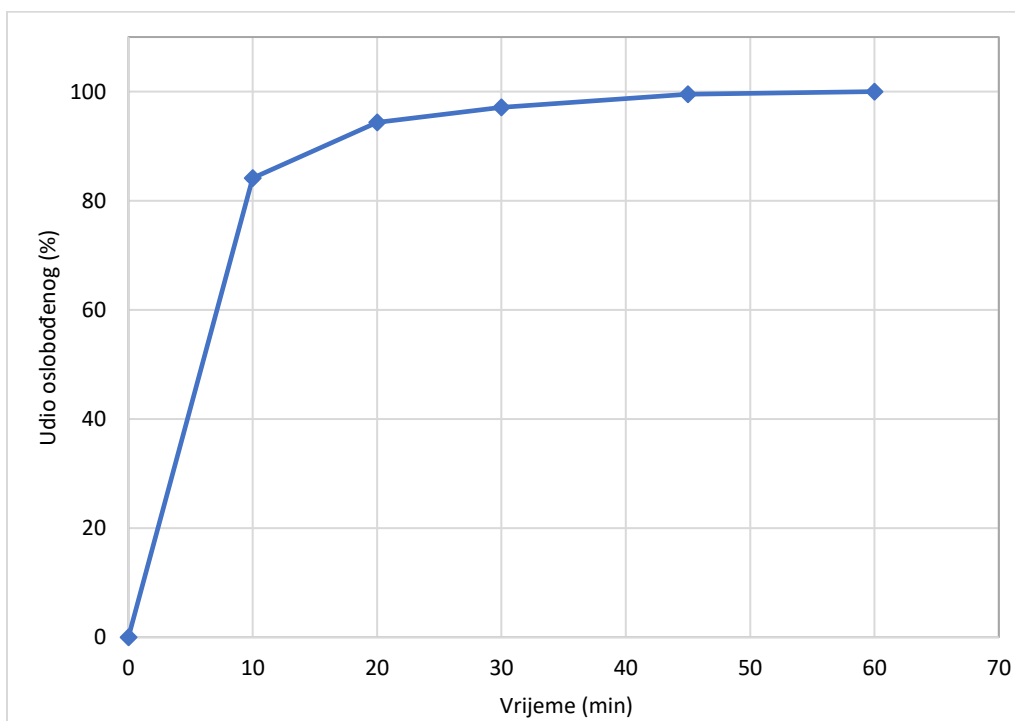
Slika 22. XRPD difraktogrami za CLX i SD4

Tablica 4. Usporedba topljivosti celekoksiba

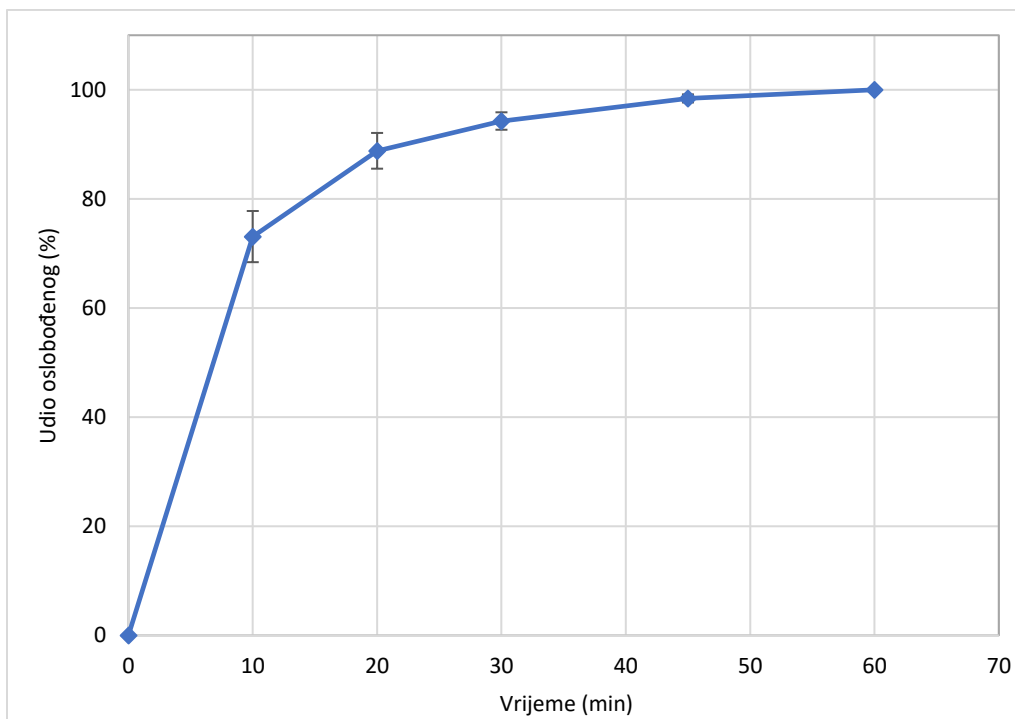
uzorak	$c / \text{mg L}^{-1}$
CLX	402,6
SD1	264,3
SD3	481,2
SD4	455,8



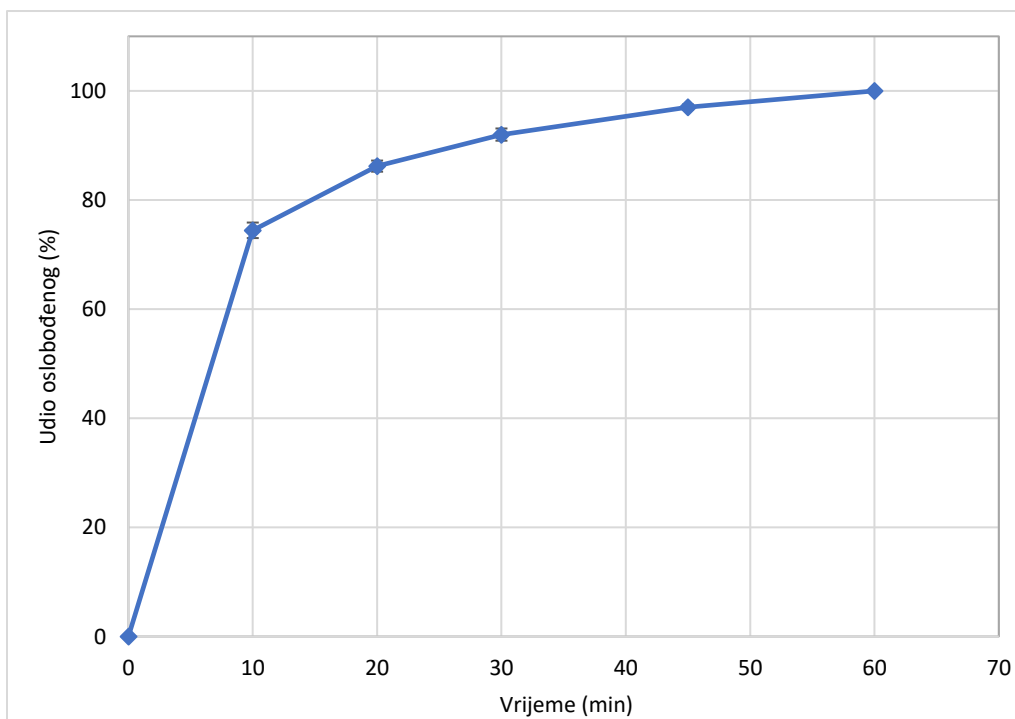
Slika 23. Ovisnost udjela oslobođenog čistog CLX-a o vremenu



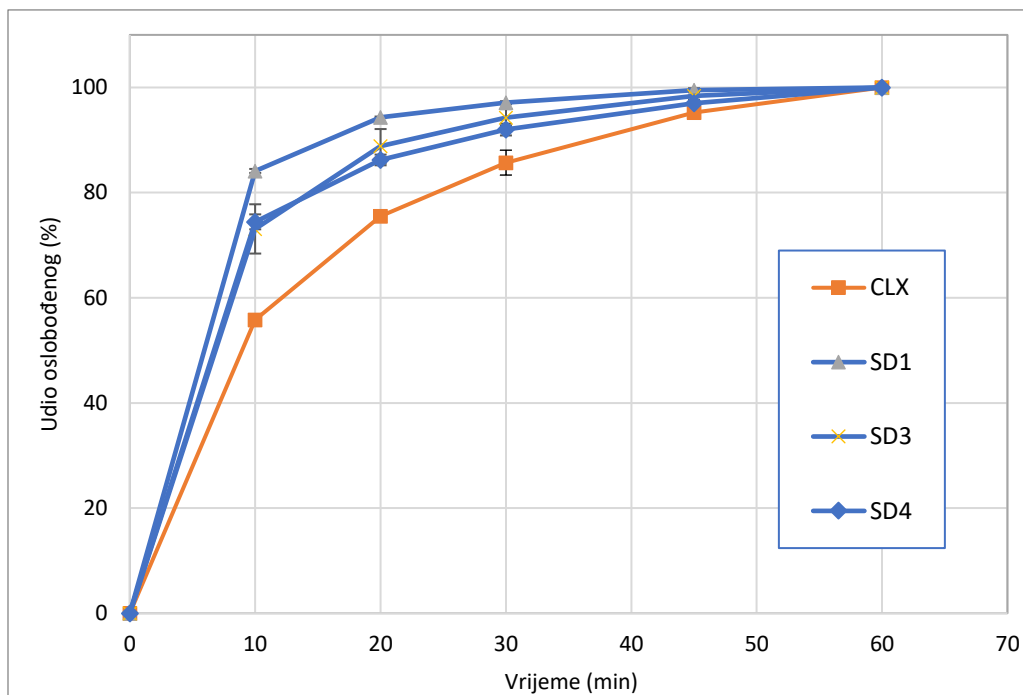
Slika 24. Ovisnost udjela oslobođenog CLX-a iz SD1 o vremenu



Slika 25. Ovisnost udjela oslobođenog CLX-a iz SD3 o vremenu



Slika 26. Ovisnost udjela oslobođenog CLX-a iz SD4 o vremenu



Slika 27. Usporedba ovisnosti udjela oslobođenog CLX-a iz uzoraka o vremenu

Tablica 5. Faktor razlike ( $f_1$ ) i faktor sličnosti ( $f_2$ ) između referentnog uzorka CLX i sušenih uzoraka SD

	SD1	SD3	SD4
$f_1$ , %	15,2	10,3	9,1
$f_2$ , %	41,5	51,3	51,8

## 5. RASPRAVA

Cilj ovog istraživanja bilo je povećanje topljivosti slabo topljive djelatne tvari, celekoksiba. Kao jedna od često korištenih metoda za povećanje topljivosti je upravo sušenje raspršivanjem. Sušenjem materijala iz otopine može nastati amorfnu struktura koja će imati veću topljivost u odnosu na inicijalnu kristalnu strukturu. [17] U ovom radu ispitane su dvije otopine celekoksiba sušene uz dva različita protoka zraka za raspršivanje. Oznake uzoraka prema korištenim otapalima i procesnim uvjetima dane su u tablicama 1 i 2.

Sušenjem raspršivanjem uglavnom su dobivene male količine proizvoda. Dobivena iskorištenja prikazana su u tablici 3 iz čega je vidljivo da je najbolje iskorištenje oko 40 % kod uzoraka SD1, SD3 i SD4. Najmanje iskorištenje dobiveno je za uzorak SD2 u kojem je celekoksib otopljen u acetonu, a sušenje se odvijalo pri manjem protoku zraka za raspršivanje ( $1,9 \times 10^{-4} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ ). Pri manjem protoku zraka dolazi do formiranja većih kapljica. [18] Prisutnost većih kapljica koje sadrže otapalo dovodi do naglog pada temperature čime se stvaraju nepovoljni uvjeti za sušenje, a što rezultira malim prinosom. Ovaj fenomen nije uočen kod uzorka SD1 koji je sušen pri istom protoku zraka za raspršivanje, ali uz etanol kao otapalo. Uzorak SD2 nije uključen u *in vitro* ispitivanja zbog malog iskorištenja. Pri većim protocima zraka za raspršivanje dobivena su veća iskorištenja za obje otopine (SD3 i SD4) kako je i očekivano.

DSC termogrami (slika 18) za čisti CLX i SD uzorke pokazuju jedan endotermni pik pri temperaturi približno 160 °C što odgovara talištu celekoksiba [19] te ukazuje na nepromijenjenu kristalnu formu svih SD uzoraka. XRPD difraktogrami (slike 19 – 22) su potvrdili kristalnu formu kod svih sušenih uzoraka (SD). Povećanje topljivosti očekivano je pretvorbom celekoksiba u amorfnu fazu što nije postignuto. Međutim, rezultati topljivosti (tablica 4) pokazuju da je kod uzoraka SD3 i SD4 dobivena veća vrijednost topljivosti ( $481,2 \text{ mg L}^{-1}$  i  $455,8 \text{ mg L}^{-1}$ ) u odnosu na čisti CLX ( $402,6 \text{ mg L}^{-1}$ ). Uzorak SD1 pokazao je vrlo male vrijednosti topljivosti ( $264,3 \text{ mg L}^{-1}$ ) što se pripisuje mogućoj eksperimentalnoj pogrešci. Brojne su metode ispitivanja topljivosti lijekova, a posebno onih slabo topljivih u vodi. Celekoksib spada u skupinu II prema BCS klasifikaciji što ga čini slabo topljivim, ali dobro permeabilnim lijekom. Ispitivanje topljivosti lijekova čija je topljivost u vodi mala često je otežano zbog čega je u ovom istraživanju topljivost ispitana u mediju korištenom za *in vitro* ispitivanja. Na taj je način zapravo *in vitro* ispitivanje korišteno kao indirektna metoda ispitivanja topljivosti kako u svom radu navode Murdande i sur. [20].

Na slikama 23 – 26 prikazani su profili oslobađanja čistog CLX i uzoraka SD1, SD3 i SD4. Slikom 27 dana je usporedba profila. Profili oslobađanja prikazuju promjenu udjela oslobođenog celekoksiba u vremenu. Usporedbom profila (slika 27) može se uočiti da se u 10. minuti oslobodilo oko 55 % čistog celekoksiba dok je za uzorke SD3 i SD4 ta vrijednost porasla na 75 %, a za SD1 čak na 85 %. Rezultati pokazuju da je došlo do bržeg oslobađanja celekoksiba kod svih SD uzoraka što ukazuje na povećanje topljivosti u ispitivanom mediju, a što je pokazao i test topljivosti. Jedina neusklađenost je uzorak SD1 kod kojeg je utvrđena smanjena topljivost, a profili pokazuju brže oslobađanje. Razlika u rezultatima upućuje da je došlo do eksperimentalne pogreške u ispitivanju topljivosti.

Povećanje topljivosti i brže oslobađanje celekoksiba posljedica je promjene u obliku i raspodjeli veličina čestica sušenih uzoraka što iziskuje dodatne potvrde upotrebom pretražne elektronske mikroskopije i odgovarajuće metode određivanja raspodjele veličina čestica.

Razlike u profilima oslobađanja kvantificirane su upotrebom faktora razlike i sličnosti koji su izračunati prema izrazima (1) i (2). Kao referentni uzorak ( $R$ ) uzet je čisti CLX, a testirani uzorci ( $T$ ) su uzorci SD1, SD3 i SD4. Rezultati su prikazani u tablici 5. Metoda usporedbe profila često se koristi prilikom razvoja generičkih lijekova kod kojih se profili proizvedenog lijeka uspoređuju s izvornik koji služi kao referentni uzorak. Općenito, vrijednosti  $f_1$  do 15 % (0 – 15) i  $f_2$  veće od 50 % (50 – 100) pokazuju ekvivalentnost između dva profila. [2, 16] Dobiveni rezultati (tablica 5) pokazali su statistički značajnu razliku profila oslobađanja celekoksiba iz uzorka SD1. Faktor razlike iznosi 15,2 % dok faktor sličnosti iznosi 41,5 % što ne ulazi u područje prihvatljivih vrijednosti. S druge strane, uzorci SD3 i SD4 pokazuju određeni stupanj sličnosti. Vrijednosti ovog faktora iznose 51,3 % i 51,8 % što bi se moglo smatrati statistički ekvivalentnim profilima. Međutim, vrijednosti su na donjim granicama intervala [50 – 100] zbog čega se smatra da je razlika u profilima ipak posljedica povećanja topljivosti.

## 6. ZAKLJUČCI

U radu je ispitana metoda sušenja raspršivanjem u svrhu poboljšanja topljivosti djelatne tvari celekoksiba.

Rezultati su pokazali da se sušenjem raspršivanjem povećala topljivost djelatne tvari celekoksiba.

XRPD difraktogrami pokazuju da je zadržana kristalna struktura u uzorcima nakon sušenja zbog čega se zaključuje da je do povećanja topljivosti došlo zbog promjene oblika i veličine čestica.

Brže oslobađanja djelatne tvari dobiveno je kod svih ispitanih uzoraka u *in vitro* testovima.

Razlika između profila oslobađanja kvantificirana je upotrebom faktora razlike i sličnosti. Faktori sličnosti pokazuju statistički značajnu razliku profila oslobađanja.

## 7. LITERATURA

- [1] Anandharamakrishnan, C., Padma Ishwarya, S., *Spray Drying Techniques for Food Ingredient Encapsulation*, John Wiley & Sons Ltd., 2015.
- [2] Y. Qiu, Y. Chen, *Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory & Practice*, Elsevier, 2017.
- [3] Lobenberg, R., Amidon, G.L., *Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards*, Eur. J. Pharm. Biopharm. **50** (2000) 3–12.
- [4] Charalabidis, A., Sfouni, M., Bergström, C., & Macheras, P., *The Biopharmaceutics Classification System (BCS) and the Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS): Beyond guidelines.*, Int. J. Pharm. **566** (2019) 264–281.
- [5] Smith, *Remington Education: Physical Pharmacy*, Pharmaceutical Press, 2016.
- [6] Shargel L., Wu-Pong S., Yu, *ABC: Applied biopharmaceutics & Pharmacokinetics, 6th Edition*, McGraw-Hill Education, 2012.
- [7] Hilden L., Morris K., *Physics of Amorphous Solids*, J. Pharm. Sci. **93** (2004) 3–12.
- [8] <https://www.embibe.com/study/amorphous-solids-concept> (preuzeto 26.8.2019.)
- [9] Hancock, B., Zografi, G., *Characteristics and Significance of the Amorphous State in Pharmaceutical Systems*, J. Pharm. Sci. **86** (1997) 1–12.
- [10] Zhang, H., Yu, L., *Dissolution Testing for Solid Oral Drug Products: Theoretical Considerations*, American Pharm. Review 7 (2004) 26–31.
- [11] Wang. Q., Fotaki, N., Mao, Y., *Biorelevant Dissolution: Methodology and Application in Drug Development*, Dissolution Techn. **16** (2009) 6–12.
- [12] USP, General Chapters <711>, <1092>, <1225>, <1088>
- [13] Motallae, S., Taheri, A., *Preparation and characterization of solid dispersions of celecoxib obtained by spray-drying ethanolic suspension containing PVP-K30 or isomalt*, J. Drug Deliv. Sci. Tech. **46** (2018) 188–196.



- [14] European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 8th Edition, 2013.
- [15] Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., Zou, A., Li, W., Yao, C., Xie, S., *DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles*, AAPS J. **12** (2010) 263–271.
- [16] Dressman, J., Krämer, J., *Pharmaceutical Dissolution Testing*, Taylor & Francis Group, 2005.
- [17] Jagadeesh Babu, N., Nangia, A., *Solubility Advantage of Amorphous Drugs and Pharmaceutical Cocrystals*, Crystal Growth & Design **11** (2011) 2662–2679.
- [18] Passos, M. L., Birchal, V. S., *Manipulating Physical Properties of Powder, u Spray Drying Technology*, Woo, M. W., Mujumbar, A. S., Daud, W. R. W. (Eds), Volume 1, Singapore, 2010, 37–60.
- [19] Primo, F. T., Fröhlich, P. E., *Celecoxib Identification Methods*, Acta Farm. Bonaerense **24** (2005) 421–425.
- [20] Murdande, S. B., Pikal, M. J., Shanker, R. M., Bogner, R. H., *Aqueous solubility of crystalline and amorphous drugs: Challenges in measurement*, Pharm. Dev. Tech. **16** (2011), 187–200.