

УДК 544.772

## Метод генерации из раствора сухих аэрозольных частиц (на примере лекарственного вещества флуконазола)

А.М. Бакланов<sup>1</sup>, А.А. Протасов<sup>1,2</sup>, М.Е. Стекленева<sup>1</sup>, С.В. Валиулин<sup>1</sup> ✉\*

<sup>1</sup>Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН

630090, г. Новосибирск, ул. Институтская, 3

<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет

630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2

Поступила в редакцию 11.01.2024;

после доработки 05.03.2024;

принята к печати 06.03.2024

Инфекционные заболевания, поражающие дыхательную систему, являются в настоящее время серьезной проблемой для здравоохранения. Одним из путей повышения эффективности терапии таких заболеваний является адресная доставка лекарственных препаратов. Такой подход требует разработки новых методов генерации аэрозоля лекарственных средств, с помощью которых можно получать частицы с размерами, позволяющими проникать в заданные участки дыхательной системы. В настоящей работе предложен и реализован метод генерации сухих аэрозольных частиц, основанный на ультразвуковом распылении раствора лекарственного вещества. На примере раствора лекарственного противогрибкового вещества флуконазола показано, что с помощью данного метода можно генерировать аэрозоль со стабильными концентрацией и средним размером частиц в течение более 2 ч. Полученный аэрозоль имеет оптимальные ингаляционные параметры: размер от 1 до 1,9 мкм, счетная концентрация  $70\,000 \pm 6500\text{ см}^{-3}$ . Представленный метод позволяет в дальнейшем проводить исследование биологического действия аэрозоля лекарственных средств.

**Ключевые слова:** аэрозоль, генератор частиц, ингаляция, флуконазол, оптический спектрометр аэрозоля; aerosol, particle generator, inhalation, fluconazole, aerosol optical spectrometer.

### Введение

Грибковые инфекции, наряду с бактериальными и вирусными, в настоящее время представляют серьезную проблему для здравоохранения [1]. Общая смертность в мире от грибковых инфекций не многим уступает смертности от туберкулеза и составляет около 1,5 млн человек в год [2, 3]. В группе риска находятся лица с ослабленным иммунитетом, особенно на фоне онкологического заболевания, ВИЧ/СПИДа, туберкулеза или после интенсивной антибактериальной терапии [1, 3]. Ситуация усугубляется тем, что существует достаточно ограниченное число классов противогрибковых препаратов и всего несколько находятся в стадии разработки [4, 5], а активное применение существующих лекарственных средств сопровождается формированием резистентности к ним у грибов [6].

Одним из подходов к повышению эффективности терапии и преодолению резистентности к действующим веществам является разработка методов

создания высокой локальной концентрации лекарственного препарата в пораженном органе [7–9]. В случае инфекции дыхательной системы таким методом может быть ингаляционная доставка. Но для эффективного применения ингаляционных способов лечения необходима возможность получения аэрозоля лекарственного вещества с заданными и контролируемыми параметрами: средний размер частиц и их концентрация. От размера частиц зависят преимущественная область их осаждения в дыхательной системе [10] и общая доза препарата, доставляемая пациенту [11].

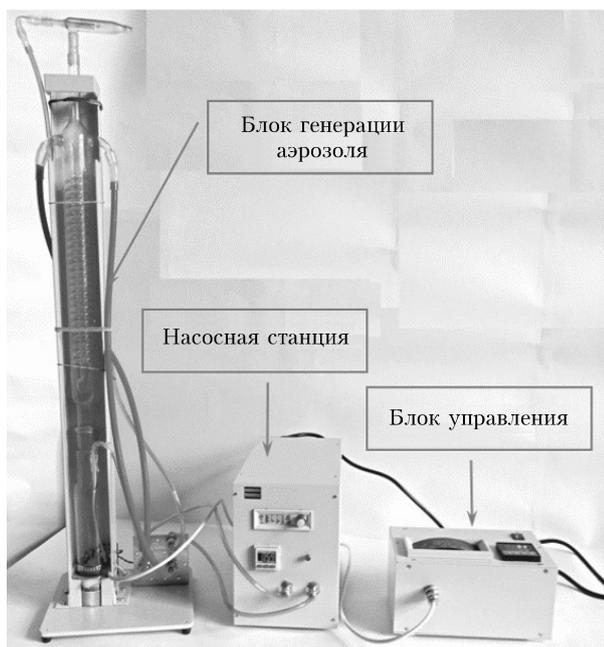
Современные медицинские ингаляторы имеют ряд недостатков [12, 13], которые не позволяют эффективно их применять: крупный размер генерируемых аэрозольных частиц или капель (3–5 мкм), низкая производительность и стабильность при генерации аэрозоля, невозможность использования для распыления лекарственных средств из неводных растворов.

Цель настоящей работы — разработка метода генерации сухих (твердых) аэрозольных частиц оптимального ингаляционного размера со стабильной концентрацией в течение долгого времени путем ультразвукового распыления из раствора и его апробация на лекарственном противогрибковом веществе флуконазоле.

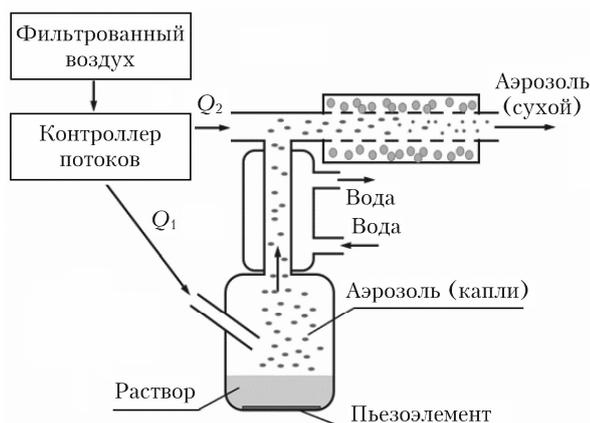
\* Анатолий Максимович Бакланов (anatoli@kinetics.nsc.ru); Арсений Александрович Протасов (sibfonet@yandex.ru); Мария Евгеньевна Стекленева (mairy-jewel@yandex.ru); Сергей Владимирович Валиулин (valiulin@kinetics.nsc.ru).

## Методика эксперимента

На рис. 1, *а* показан общий вид генератора, используемого для получения аэрозоля. Прибор состоит из трех независимых элементов, функционально объединенных между собой: блока управления; насосной станции, обеспечивающей контролируемую подачу фильтрованного воздуха; блока генерации аэрозоля, посредством которого происходит продуцирование аэрозольных частиц. Принципиальная схема функционирования блока генерации аэрозоля представлена на рис. 1, *б*.



*а*



*б*

Рис. 1. Генератор аэрозольных частиц: общий вид (*а*); принципиальная схема блока генерации аэрозоля с осушителем (*б*)

Принцип работы блока генерации аэрозоля заключается в следующем. В дно цилиндрической стеклянной кюветы объемом  $200 \text{ см}^3$  встроен пьезоэлемент ( $1,7 \text{ МГц}$ ). Раствор исследуемого вещества ( $15\text{--}20 \text{ см}^3$ ) заливается в кювету через боковой шту-

цер. За счет колебаний пьезоэлемента происходит образование аэрозоля в виде капель раствора. Этот аэрозоль увлекается потоком фильтрованного воздуха ( $Q_1 = 0,3 \text{ л/мин}$ ), который подается через боковой штуцер кюветы. Поток аэрозоля из кюветы поступает в вертикальный холодильник, охлаждаемый холодной водой ( $10 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Здесь происходит конденсация на стенке пара растворителя, который был захвачен потоком воздуха, и частичное испарение растворителя из капель аэрозоля. Конденсирующиеся пары стекают вниз, обратно в кювету. На выходе из холодильника поток аэрозоля  $Q_1$  смешивается с потоком сухого воздуха ( $Q_2 = 2,8 \text{ л/мин}$ ), и сформировавшийся новый аэрозольный поток ( $Q_1 + Q_2$ ) движется из блока генерации аэрозоля в осушитель, в котором происходит окончательное испарение растворителя и формирование сухих (твердых) аэрозольных частиц.

Осушитель конструктивно представляет собой металлическую цилиндрическую трубу (длина  $70$ , диаметр  $10 \text{ см}$ ), по оси которой проложен канал диаметром  $1 \text{ см}$ , сформированный из металлической сетки, вдоль канала по всей длине труба заполнена силикагелем.

Соотношение потоков  $Q_1$  и  $Q_2$  было подобрано так, чтобы не происходил захват излишних паров растворителя из кюветы, потеря частиц размером  $0,5\text{--}3 \text{ мкм}$  при движении в канале осушителя составляла не более  $10\%$ , а капли, поступающие из кюветы, успевали испариться к моменту выхода из осушителя.

Окончательный размер генерируемых сухих аэрозольных частиц зависит от количества вещества в образующейся капле и определяется концентрацией исследуемого вещества в растворе, помещаемом в кювету.

Размер частиц и концентрацию на выходе из генератора определяли с помощью оптического спектрометра аэрозоля ОСА. Данный прибор, разработанный и созданный в ИХКГ СО РАН, позволяет измерять концентрацию частиц (счетную в диапазоне от  $10$  до  $5 \cdot 10^5 \text{ см}^{-3}$ ) и распределение их по размерам в диапазоне от  $0,3\text{--}10 \text{ мкм}$  [11]. Работа спектрометра основана на регистрации амплитуды света, рассеянного аэрозольной частицей при ее пролете через луч источника излучения [14–16].

В настоящей работе для генерации аэрозоля использовался раствор противогрибкового вещества флуконазола ( $\geq 98\%$ , Aladdin Biochemical Technology Co., Ltd) в этиловом спирте ( $95\% \text{ об.}$ ).

## Результаты и обсуждение

Как было уже отмечено, распыление из раствора приводит к образованию в первую очередь капель, которые, осушаясь, превращаются в сухой аэрозоль. Необходимо было убедиться, что в предлагаемой конструкции и при указанных величинах потоков газа осушение происходит полностью. Для этого сразу после выхода из осушителя аэрозоль отбирали на стекловолокнистый фильтр (Whatman

GF/A, 25 мм) и взвешивали, затем фильтр с осадком осушали в эксикаторе в течение суток и проводили повторное взвешивание. Изменение массы — не более 5%, т.е. аэрозоль состоит из сухих частиц.

На рис. 2 приведены зависимости массовой концентрации и среднего размера аэрозольных частиц от массовой доли флуконазола в растворе, измеренные с помощью ОСА. Видно, что с возрастанием массовой доли вещества в растворе увеличивается средний размер частиц (рис. 2, а). Необходимо отметить, что счетная концентрация частиц практически не зависела от массы вещества в растворе и составляла  $70\,000 \pm 6500\text{ см}^{-3}$ . Объясняется это постоянной частотой колебаний пьезоэлемента и, следовательно, генерацией одинакового числа капель при распылении раствора в единицу времени. Поэтому увеличение массовой концентрации частиц (рис. 2, б) обусловлено ростом их среднего размера и строго следует кубической зависимости.

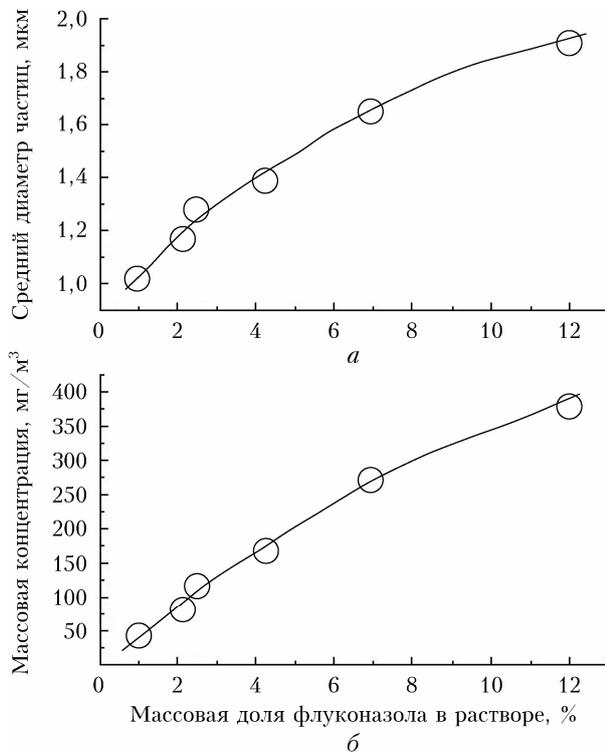


Рис. 2. Зависимость среднего размера частиц (а) и массовой концентрации частиц (б) от массовой доли флуконазола в растворе (растворитель — этанол 95% об.)

Время стабильной генерации аэрозоля имеет естественное ограничение, обусловленное убылью раствора вследствие его распыления. С помощью представленного генератора можно получать стабильный аэрозоль в течение не менее 60 мин при объеме помещенного в кювету распылителя  $15\text{ см}^3$  раствора. Быстрая замена раствора на новый в ходе эксперимента позволяет продолжить генерацию аэрозоля с тем же уровнем концентрации и средним размером частиц (рис. 3). В среднем продолжительность эксперимента, связанного с ингаляционной доставкой лекарственного вещества лабораторным

животным, составляет 10–30 мин [11, 17], однако бывают и более долгие эксперименты — до 3–4 ч, связанные с исследованием острой и хронической токсичности. Как видно из рис. 3, предложенный метод генерации аэрозоля позволяет проводить такие исследования, обеспечивая стабильную концентрацию и средний размер частиц.

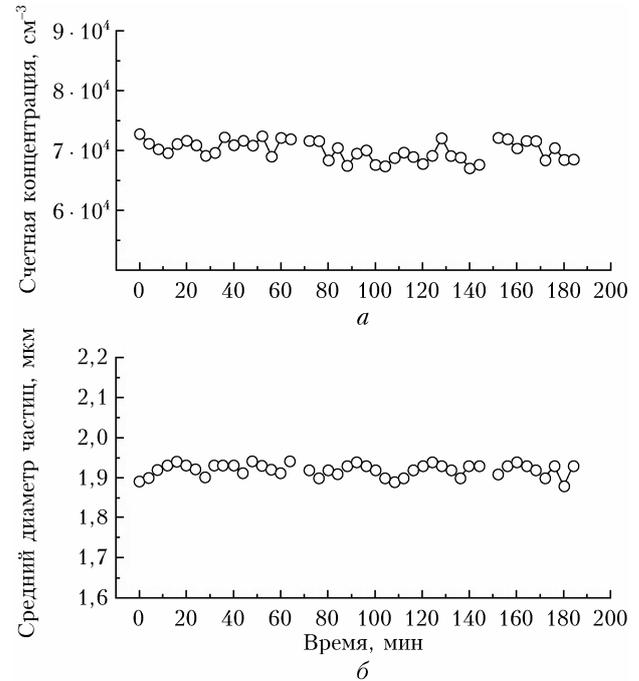


Рис. 3. Зависимость концентрации (а) и среднего диаметра аэрозольных частиц (б) от времени генерации. Массовая доля флуконазола в растворе 12%

Данные, приведенные на рис. 2, позволяют оценить величину общей ингаляционной дозы (Dose), которая может быть доставлена лабораторным мышам за типичное время ингаляции 20 мин. Для этого воспользуемся выражением [11]:

$$\text{Dose} = \frac{c\varepsilon V_m t_0}{\text{BW}}, \quad (1)$$

где  $c$  — массовая концентрация аэрозольных частиц,  $\text{мкг}/\text{см}^3$ ;

$$\varepsilon(d) = 0,85 \exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{\ln(d/4,0(nm))}{2,2}\right)^2\right) + 0,60 \exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{\ln(d/1590(nm))}{1,1}\right)^2\right)$$

— доля частиц данного диаметра  $d$ ,  $\text{нм}$ , оседающих в дыхательных путях мыши;  $V_m = 595 \cdot (\text{BW})^{0,75}$  — минутный объем дыхания мыши [18];  $t_0$  — время ингаляции;  $\text{BW} \approx 0,022\text{ кг}$  — вес мыши.

На основании формулы (1) и данных рис. 2 находим, что предложенный метод позволяет за 20 мин доставлять аэрозоль флуконазола в широком диапазоне значений общей ингаляционной дозы — от 0,7 до 7  $\text{мг}/\text{кг}$ .

## Заклучение

Представлен метод, позволяющий получать аэрозоль путем ультразвукового распыления раствора с последующим осушением образующихся капель. На примере раствора лекарственного противогрибкового вещества флуконазола в этиловом спирте 95% об. проведена генерация аэрозоля данным методом. Показано, что с его помощью можно генерировать аэрозоль со стабильной концентрацией и средним размером частиц в течение более 2 ч.

Варьируя массовую долю флуконазола в растворе от 1 до 12%, удалось получить аэрозоль со средним размером частиц от 1 до 1,9 мкм с постоянной счетной концентрацией частиц  $70\,000 \pm 6500\text{ см}^{-3}$ .

Данный метод генерации аэрозоля позволяет исследовать биологическое действие флуконазола при его ингаляционном введении лабораторным мышам в широком диапазоне значений доставляемой дозы, от 0,7 до 7 мг/кг, за время экспозиции 20 мин.

**Финансирование.** Исследование выполнено при поддержке РФФИ (грант № 19-73-10143) (<https://rscf.ru/project/19-73-10143>).

## Список литературы

1. WHO Fungal Priority Pathogens List to Guide Research, Development and Public Health Action. Geneva: World Health Organization, 2022. 48 p.
2. Brown D.G., Denning D.W., Gowen N.A., Levitz S.M., Netea M.G., White T.C. Hidden killers: human fungal infections // *Sci. Trans. Med.* 2012. V. 19, N 4. DOI: 10.1126/scitranslmed.3004404.
3. Rayens E., Norris K.A. Prevalence and healthcare burden of fungal infections in the United States, 2018 // *Open Forum Infect. Dis.* 2022. V. 9, N 1. DOI: 10.1093/ofid/ofab593.
4. McKenry P.T., Nessel T.A., Zito P.M. Antifungal Antibiotics. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2023. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538168/> (last access: 23.01.2024).
5. Еремичева Н.В., Дурнев А.Д., Васильева Н.В., Богомолова Т.С. Фармакологические мишени действия противогрибковых лекарственных соединений и практика создания новых антимикотиков (обзор) // *Проблемы медицинской микологии.* 2018. Т. 20, № 2. С. 9–17.
6. Иванова Л.В., Баринцевич Е.П., Шляхто Е.В. Резистентность грибов-патогенов к антимикотикам (обзор) // *Проблемы медицинской микологии.* 2011. Т. 13, № 1. С. 14–17.
7. Gao J., Karp J.M., Langer R., Joshi N. The future of drug delivery // *Chem. Mater.* 2023. V. 35, N 2. P. 359–363. DOI: 10.1021/acs.chemmater.2c03003.
8. Gao W., Chen Y., Zhang Y., Zhang Q., Zhang L. Nanoparticle-based local antimicrobial drug delivery // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2018. V. 127. P. 46–57. DOI: 10.1016/j.addr.2017.09.015.
9. Wassif R.K., Elkayal M., Shamma R.N., Elkheshenb S.A. Recent advances in the local antibiotics delivery systems for management of osteomyelitis // *Drug Delivery.* 2021. V. 28, N 1. P. 2392–2414. DOI: 10.1080/10717544.2021.1998246.
10. Darquenne C. Aerosol deposition in health and disease // *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Delivery.* 2012. V. 25, N 3. P. 140–147. DOI: 10.1089/jamp.2011.0916.
11. Valiulin S.V., Onischuk A.A., Baklanov A.M., Dubtsov S.N., Dultseva G.G., An'kov S.V., Tolstikova T.G., Belogorodtsev S.N., Schwartz Y.Sh. Studies of the specific activity of aerosolized isoniazid against tuberculosis in a mouse model // *Antibiotics.* 2022. V. 11, N 1527. P. 1–17. DOI: 10.3390/antibiotics11111527.
12. Dolovich M.B., Dhand R. Aerosol drug delivery: Developments in device design and clinical use // *Lancet.* 2011. V. 377. P. 1032–1045. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60926-9.
13. Mukherjee B., Paul P., Dutta L., Chakraborty S., Dhara M., Mondal L., Sengupta S. Chapter 14 – Pulmonary Administration of biodegradable drug nanocarriers for more efficacious treatment of fungal infections in lungs: Insights based on recent findings // *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics.* Amsterdam: Elsevier, 2017. P. 261–280.
14. Райсман П. Аэрозоли. Введение в теорию: пер. с англ. М.: Мир, 1987. 278 с.
15. Полюкин В.В. Учет зависимости границ диапазонов размеров частиц от комплексного показателя преломления материала частиц в фотоэлектрических счетчиках // *Оптика атмосф. и океана.* 2017. Т. 30, № 5. С. 442–446. DOI: 10.15372/AOO20170514.
16. Самойлова С.В. Совместное восстановление комплексного показателя преломления и функции распределения частиц по размерам по лидарным измерениям: тестирование разработанных алгоритмов // *Оптика атмосф. и океана.* 2019. Т. 32, № 7. С. 525–538; *Samoilova S.V. Simultaneous reconstruction of the complex refractive index and the particle size distribution function from lidar measurements: Testing the developed algorithms // Atmos. Ocean. Opt.* 2019. V. 32, N 6. P. 628–642. DOI: 10.1134/S1024856019060137.
17. Valiulin S.V., Onischuk A.A., Baklanov A.M., Dubtsov S.N., An'kov S.V., Shkil N.N., Nefedova E.V., Plokhotnichenko M.E., Tolstikova T.G., Dolgov A.M., Dultseva G.G. Aerosol inhalation delivery of cefazolin in mice: Pharmacokinetic measurements and antibacterial effect // *Int. J. Pharm.* 2021. V. 607. P. 121013. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.121013.
18. Arms A.D., Travis C.C. Reference Physiological Parameters in Pharmacokinetic Modeling: Technical Report. Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Health and Environmental Assessment, 1988. 130 p.

A.M. Baklanov, A.A. Protasov, M.E. Stekleneva, S.V. Valiulin. Method for generating dry aerosol particles from a solution: the case of fluconazole.

Infectious diseases affecting the respiratory system are currently a serious medical problem. One of the ways to increase the effectiveness of therapy for such diseases is targeted delivery of drugs. This approach requires the development of new methods for generating aerosols of drugs, with the help of which it is possible to obtain particles with sizes that allow them to penetrate into specified areas of the respiratory system. In this work, a method for generating dry aerosol particles based on ultrasonic spraying of a drug solution is proposed and implemented. Using the example of a solution of the medicinal antifungal substance fluconazole, it is shown that this method enables generating aerosol with a stable concentration and an average size of particles for more than 2 hours. The resulting aerosol has optimal inhalation parameters: size from 1 to 1.9 microns and count concentration of  $70,000 \pm 6500\text{ cm}^{-3}$ . The presented method makes it possible to further study the biological effect of aerosols of drugs.