

## PŮVODNÍ PRÁCE

# Optimalizace přípravy sprejově sušených porézních mikročástic pro podání do plic

## Optimization of spray-dried porous microparticles preparation for pulmonary delivery

Andrea Peštálová • Hana Hořavová • Jan Gajdziok

Došlo 28. března 2023 / Přijato 26. dubna 2023

### Souhrn

Inhalační podání suchých práškových částic je využívanou aplikační cestou pro dosažení lokálního i systémového působení léčiv. U plicních onemocnění je žádoucí depozice léčiv v místě účinku. Pro efektivní léčbu jsou tak zásadní parametry inhalovaných částic, a to především jejich velikost, tvar nebo aerosolizační parametry. Vhodných parametrů je možné dosáhnout volbou metody přípravy nebo pomocných látek (nosičů, porogenu nebo aerosolizačních činidel). Cílem experimentu byla příprava jedenácti šarží práškových směsí sprejovým sušením, které se lišily použitým nosičem, množstvím leucinu či porogenu. Cílem bylo optimalizovat složení pro navázání léčiva s ohledem na požadavky pro plicní podání. Připravené částice byly zhodnoceny z hlediska morfologie, tokových vlastností, pórovitosti, geometrického i aerodynamického průměru. Bylo zjištěno, že se zvyšující se koncentrací leucinu se sypaná hustota částic snižovala a zároveň rostla hodnota FPF. Stejně tak docházelo i ke snižování MMAD. Jako vhodná se jevila šarže obsahující 15 % leucinu. Při stanovení optimální koncentrace porogenu (hydrogenuhličitan amonný) u manitolových částic dosahovala nejlepších výsledků šarže s jeho 1% zastoupením, vzhledem k vyhovující velikosti částic oproti ostatním šaržím (MMAD  $5,92 \pm 1,32 \mu\text{m}$ ), vhodné pórovitosti a obecně přijatelné morfologii částic. Za účelem formulace částic s navázaným léčivem by tedy bylo vhodné snížit aerodynamický průměr částic např. úpravou procesních parametrů sprejového sušení.

**Klíčová slova:** inhalační podání • mikročástice • sprejové sušení • leucin • porogeny

### Summary

Inhalation administration of dry powder particles is a common application route to achieve local and systemic drug effects. For pulmonary diseases, the deposition of drugs at the site of action is desirable. Thus, the parameters of the inhaled particles, especially their size, shape, or aerosolization, are essential for effective treatment. Suitable parameters can be achieved by choice of preparation method or excipients (carriers, porogens, or aerosolizing agents). This experiment aimed to prepare 11 batches of powder mixtures by spray drying, which differed in the carrier used and the amount of leucine or porogen. The aim was to optimize the formulation for drug binding concerning the requirements for pulmonary administration. The prepared particles were evaluated in terms of morphology, flow properties, porosity, and geometric and aerodynamic diameter. It was found that with increasing concentration of leucine, the bulk density of the particles decreased while the FPF value increased. Similarly, there was a decrease in MMAD. The batch containing 15% leucine was the most suitable. In determining the optimum porogen concentration for mannitol particles, the batch with its 1% gave the best results due to its adequate particle size compared to the other batches (MMAD  $5.92 \pm 1.32 \mu\text{m}$ ), suitable porosity, and particle morphology. Thus, to formulate drug-loaded particles, it would be advisable to reduce the aerodynamic diameter of the particles, e.g., by spray drying process parameters.

**Key words:** inhalation administration • microparticles • spray drying • leucine • porogens

### Úvod

Inhalačního podání léčiv se často využívá v léčbě plicních onemocnění, jako je asthma bronchiale, chronická obstrukční plicní nemoc nebo plicní hypertenze či cystická fibróza. V těchto případech je žádoucí cílená

depozice léčiv v místě účinku za účelem dosažení maximální možné koncentrace léčiva a zároveň minimalizace nežádoucích účinků spojených se systémovou absorpcí. Pro cílenou depozici částic v plicích je klíčová specifická velikost (< 5 µm), morfologie a další vlastnosti inhalovaných částic. Biologická dostupnost inhalačně podaných léčiv je často nedostatečná z důvodu přirozeně se vyskytujících čistících mechanismů v plicích (mukociliární clearance), kterými jsou částice odstraňovány horními cestami dýchacími. Deponované částice mohou být také rozpoznány a následně fagocytovány alveolárními makrofágy. Tyto ochranné mechanismy dýchacích cest a plic vedou k častějšímu dávkování léčiv souvisejícím s neefektivní léčbou<sup>1,2)</sup>.

Z tohoto důvodu se dostaly do popředí zájmu tzv. velké porézní mikročástice (LPP – large porous particles) s geometrickým průměrem i více než 10 µm a velmi nízkou sypanou/setřesnou hustotou (< 0,4 g/cm<sup>3</sup>), které si zachovávají vhodný tzv. aerodynamický průměr (MMAD). Aerodynamický průměr je parametr, který popisuje chování částic ve vzduchu a je definován jako průměr sférické částice o hustotě 1 g/cm<sup>3</sup>, jejíž sedimentační rychlost nabývá v gravitačním poli stejné hodnoty jako sledovaná částice. Reálnou hodnotu MMAD je možné stanovit pomocí kaskádových impaktorů a pro sférické částice lze použít zjednodušený výpočet [1], kde  $d_a$  představuje aerodynamický průměr,  $\rho$  je hustota částice a  $D$  je hodnota geometrického průměru částice<sup>3,4)</sup>.

$$d_a (\mu\text{m}) = \sqrt{\rho \times D} \quad [1]$$

Oproti menším částicím dochází mezi LPP k nižší četnosti interakcí mezi jednotlivými částicemi, a tedy lepší aerosolizaci z inhalátoru usnadňující proniknutí částic až hluboko do plic<sup>5)</sup>. Takové částice jsou navíc schopny vyhnout se čistícím mechanismům v plicích. Kromě velikosti je pro LPP charakteristická jejich pórovitost. Zejména velikost pórů ve struktuře mikročástic a jejich velikostní distribuce mají vliv na schopnost mikročástic udržet navázané léčivo uvnitř struktury a také na profil jeho uvolňování<sup>6,7)</sup>.

Regulace mikrostruktury částic je možná prostřednictvím **porogenů**, což jsou látky, které vytvářejí uvnitř struktury částic póry. Porogeny jsou vůči stavebnímu materiálu mikročástic inertní, popřípadě s ním reagují reverzibilně. Samotná tvorba pórů může probíhat na povrchu částic za vzniku vnějších pórů nebo uvnitř struktury, kde se vytvářejí póry vnitřní. Právě množství pórů, jejich velikost a struktura mají značný vliv na vlastnosti finálního prášku k inhalaci. Porogeny mohou být pevné látky i kapaliny, organické či anorganické povahy a volí se podle polaritativy a rozpustnosti a jejich vzájemné kompatibility s ostatními složkami formulace<sup>8,9)</sup>.

Podle mechanismu tvorby pórů je možné porogeny rozdělit na osmoticky aktivní látky (osmogeny), mezi které se řadí např. cyklodextriny nebo chlorid sodný. Další skupinou jsou látky, které je možné extrahovat

(nejčastěji vymýváním) ze struktury částice, např. polyvinylpyrrolidon nebo Pluronic®. Třetí skupina zahrnuje těkavé porogeny, které vyvíjejí plyny během jejich rozkladu, což je např. hydrogenuhličitán amonný a sodný nebo menthol<sup>10)</sup>. Při přípravě LPP se volí nejčastěji těkavé porogeny, s jejichž použitím nedochází k takovým ztrátám léčiva skrz vzniklé póry, a zvyšuje se tak účinnost enkapsulace léčiva. U těchto látek dochází během jejich rozkladu k tvorbě porézní struktury prostřednictvím vývinu plynu. K rozkladu dochází buď vlivem pH, nebo změnou teploty (36–60 °C), ke které dochází například využitím metod přípravy LPP, jako je sprejové sušení<sup>10)</sup>.

Kromě porozity je u porézních mikročástic možné modifikovat i další vlastnosti, jako jsou tokové a aerosolizační vlastnosti, adhezivita/kohezivita či hygroskopicitata. Pro zlepšení aerosolizačních vlastností výsledného prášku, jeho stability a možnost řízeného uvolňování léčivé látky se využívají látky ze skupiny aminokyselin, stearan hořečnatý nebo látky na bázi fosfatidylcholinu. Nejčastěji využívaným enhancerem aerosolizačních vlastností mikročástic je **leucin**<sup>11)</sup>. Je jednou z osmi esenciálních aminokyselin vyskytujících se ve dvou enantiomerních formách (L a D). Podle Hoe et al. však záměna forem nemá vliv na aerosolizační vlastnosti prášku připraveného sprejovým sušením<sup>12)</sup>. Leucin ovlivňuje dispergovatelnost částic tak, že na jejich povrchu vytváří hydrofobní film tvořený jako následek jeho rychlé krystalizace na povrchu kapek během procesu sušení. V důsledku vytvoření této vrstvy dochází ke snižování mezipovrchových sil mezi jednotlivými částicemi, které se následně při inhalaci lépe rozptylují na jednotlivé částice<sup>13)</sup>. Díky svým vlastnostem, které se do jisté míry shodují s plicním surfaktantem, dokáže leucin snižovat kohezivní síly mezi částicemi, napomáhá ke snížení hmotnostního středního aerodynamického průměru (MMAD) a chrání prášek před vzdušnou vlhkostí. Právě tyto pozitivní vlastnosti zaznamenali při svém experimentu Prota et al. Prokázali, že při použití naringinu formulovaného do podoby mikročástic s obsahem leucinu došlo ke zlepšení aerosolizačních vlastností vedoucím k vyšší naměřené aktivitě plicních epiteliálních buněk, což je klíčové například u cystické fibrózy<sup>14)</sup>. Pozitivní vliv na vlastnosti mikročástic ve formě suchého prášku byl však zaznamenán i u fenylalaninu, threoninu, argininu, glycinu nebo kyseliny asparagové<sup>11)</sup>.

Za účelem splnění požadavků, které jsou na inhalovatelné mikročástice kladeny, se nabízí možnost kombinace nosičů mikročástic s porogeny, resp. látkami upravující aerosolizační vlastnosti částic. Optimalizace složení inhalovatelných mikročástic obsahujících variabilní množství leucinu a hydrogenuhličitánu amonného je proto předmětem této experimentální práce. Pro zhodnocení fyzikálních vlastností se použily metody, jako je laserová difrakce, heliový pyknometr, skenovací elektronová mikroskopie, aerodynamický spektrometr částic apod.

## Pokusná část

### Materiály

Pro přípravu mikročástic sprejovým sušením se zvolily jako nosiče maltodextrin (DE 9) a D-manitol (Penta s. r. o., Česká republika). Dále se pro zvýšení dispergovatelnosti prášku a zlepšení aerosolizačních vlastností použil L-leucin (My protein, Velká Británie). Za účelem zvýšení pórovitosti ve struktuře částic se zvolil jako těkavý porogen hydrogenuhličitan amonný (Penta s. r. o., Česká republika). K testování vzorků z hlediska velikostní distribuce částic s využitím laserové difrakce se jako dispergační činidlo použil isopropylalkohol (Penta s. r. o., Česká republika). Čištěná voda lékopisné kvality byla připravena pomocí přístroje pro úpravu vody pomocí reverzní osmózy (Rodem 4, Aqua Osmotic, Česká republika).

### Metodika

#### Metoda přípravy mikročástic

Příprava mikročástic byla rozdělena do několika na sebe navazujících kroků s cílem získat mikročástice splňující parametry a požadavky pro plicní podání. Pro přípravu se zvolila metoda sprejového sušení ve sprejové sušárně (LabPlant SD-06, Velká Británie) s fixními procesními parametry pro všechny formulace, které jsou uvedeny v tabulce 1. Zvolila se dvoukapalinová tryska o průměru 1 mm opatřená deblockerem nastaveným na střední rychlost, který sloužil k pravidelnému prorážení trysky, a bránil tak jejímu ucpání. Za účelem optimalizace vlastností mikročástic byly zvoleny různé pomocné látky, ať už se jednalo o nosiče (maltodextrin, manitol), nebo o látky vytvářející uvnitř struktury částice póry (hydrogenuhličitan amonný – ABC) či zlepšující

aerosolizační vlastnosti (leucin). Označení a složení jednotlivých vzorků shrnuje tabulka 2. Jakmile byl vysušen celý objem kapaliny, výsledný produkt se umístil do exsikatoru před následným hodnocením.

#### Příprava mikročástic na bázi maltodextrinu s variabilním množstvím leucinu

V první fázi experimentu byly připraveny šarže MX\_1 až MX\_5 na bázi maltodextrinu (nosič) a leucinu (enhancer aerosolizačních vlastností prášku a antiadhezivum). Šarže obsahovaly variabilní množství leucinu v koncentraci 1–20 % vždy na úkor maltodextrinu. Nejprve se nechal rozpustit leucin v celkovém objemu vody vzhledem k tomu, že je špatně smáčen a rozpouští se pomalu. Ve vzniklém roztoku se následně rozpustil maltodextrin do celkové hmotnosti disperze 500 g. Celková koncentrace pevné složky zůstávala neměnná (10 %). Cílem této fáze bylo získat šarže s koncentrací leucinu, která by vykazovala optimální vlastnosti částic (velikost částic, tokové vlastnosti, tvar apod.) pro inhalační podání. Tato koncentrace leucinu se následně použila pro další fázi experimentu.

#### Příprava mikročástic na bázi manitolu s variabilním množstvím porogenu

Druhá fáze spočívala v přípravě šarží na bázi manitolu (nosič) a leucinu s variabilním množstvím ABC (porogen) (šarže MN\_6 až MN\_11). Z předchozí fáze se zvolila koncentrace leucinu 15 % pevného podílu, která zde byla zachována. Jednotlivé šarže se lišily v množství přidaného porogenu (0,25–1,5 %) na úkor manitolu. Při rozpouštění se postupovalo obdobně jako u předchozích šarží, tedy nejprve se rozpustil leucin za vzniku roztoku, ve kterém se následně rozpustil manitol a ABC. Pro srovnání byla připravena i šarže bez poro-

Tab. 1. Parametry a podmínky sprejového sušení

Vstupní teplota (°C)	Výstupní teplota (°C)	Rychlost pumpy (ml/h)	Průtok vzduchu (m/s)	Atomizační tlak (bar)
150	64–82	900	4,3	3

Tab. 2. Označení a složení jednotlivých šarží

Šarže	Maltodextrin (g)	Manitol (g)	Leucin (g)	ABC (g)	Voda (g)	Koncentrace pevného podílu (%)
MX_1	49,5	–	0,50	–	450	10
MX_2	47,5	–	2,50	–	450	10
MX_3	45,0	–	5,00	–	450	10
MX_4	42,5	–	7,50	–	450	10
MX_5	40,0	–	10,0	–	450	10
MN_6	–	42,500	7,50	–	450	10
MN_7	–	42,375	7,50	0,125	450	10
MN_8	–	42,250	7,50	0,250	450	10
MN_9	–	42,125	7,50	0,375	450	10
MN_10	–	42,000	7,50	0,500	450	10
MN_11	–	41,750	7,50	0,750	450	10

generu (MN\_6). Celková koncentrace pevné složky byla opět neměnná (10 %) a celková hmotnost vzniklé kapaliny byla 500 g. Cílem této fáze bylo zjistit optimální množství porogenu, aby byly vytvořeny částice vhodné pórovitosti tak, aby vyhovovaly inhalačnímu podání. Taková koncentrace ABC se následně využila jako optimální pro navazující experimenty.

### Hodnocení připravených mikročástic

#### Morfologie částic

Morfologie a tvar povrchu byly hodnoceny pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) (Mira 3, Tescan, Česká republika). Příprava samotného měření probíhala v několika krocích. Nejprve se připravily hliníkové držáky (stuby), na které byla nalepena vodivá uhlíková páska. Štětce byla nanášena tenká vrstva vzorku. Poté byly vzorky potaženy 10nm vrstvou zlata (Quorum technologies, typ Q150R ES, Laughton, Velká Británie), aby se získal vodivý povrch. Pracovalo se při režimu vysokého vakua s urychlovacím napětím 5 kV. Byl detekován signál sekundárních elektronů a u každého vzorku byly pořízeny snímky při zvětšení 5000x.

#### Tokové vlastnosti a hustota suchého prášku

Hustota a tokové vlastnosti sprejově sušeného prášku byly stanoveny prostřednictvím sypné a setřesné hustoty, Hausnerova poměru (HP), indexu stlačitelnosti (IS) a pyknometrické hustoty. Hodnoty Hausnerova poměru a indexu stlačitelnosti byly vypočítány na základě sypných a setřesných hustot získaných sklepáváním odměrného válce upevněného ke sklepávacímu přístroji (SVM 102, Erweka GmbH, Německo). Pro měření byla do 50ml odměrného válce (25 ml u nižších výtěžků) nasypána známá hmotnost vzorku a prášek byl sklepáván 10krát, 500krát a 1250krát s následným odečtením objemu<sup>15</sup>. Pyknometrická hustota byla vyhodnocena heliovým pyknometrem (Pycnomatic ATC, Porotec, GmbH, Německo). Všechna měření byla provedena ve třech opakováních.

#### Pórovitost práškových materiálů

Z naměřené setřesné hustoty a hustoty pyknometrické je možné získat informace o pórovitosti daného práškového materiálu. Ta je definována jako objem otevřených pórů v dané látce (mezi částicemi i v částicích samotných) k celkovému objemu látky [2]<sup>16</sup>.

$$\text{pórovitost} = (1 - \rho_{\text{setřesná}} / \rho_{\text{pyknometrická}}) \times 100 \quad [2]$$

#### Velikost částic měřená laserovou difrakcí

Mezi metody, které jsou v poslední době preferovány pro stanovení distribuce velikosti mikročástic, patří laserová difrakce. Jedná se o optickou metodu využívající hodnoty úhlu a intenzity rozptýleného světla. Informace o velikosti částic lze získat pomocí Mieho teorie. Kromě distribuční křivky jsou částice charakterizovány kumulativní křivkou a percentilovými hodnotami D (D<sub>10</sub> a D<sub>90</sub>). Tyto hodnoty udávají statistickou hodnotu

velikosti, do které spadá 10 %, resp. 90 % všech částic. Optická analýza pomocí laserové difrakce vychází z předpokladu, že zkoumané částice mají kulovitý tvar. V opačném případě dochází k odchýlkám v rozptylu laserového paprsku a naměřená velikostní distribuce částic nemusí odpovídat skutečnému rozdělení. K měření takových částic je proto vhodné použít jiné metody, například SEM nebo aerodynamický spektrometr částic (APS). Měření bylo provedeno pomocí laserové difrakce (Partica LA-690, Horiba, Japonsko). Jako disperzní médium byl pro všechny formulace použit isopropanol. Před zahájením měření byl každý vzorek sonikován po dobu 5 minut, aby se rozrušily případné aglomeráty. Výsledné hodnoty jsou průměrem tří měření.

#### Aerodynamická velikost částic

Aerodynamický spektrometr částic (APS) je alternativní metodou ke kaskádovým impaktorům pro stanovení aerodynamické velikostní distribuce částic a hmotnostního mediánu aerodynamického průměru (MMAD), charakterizující velikost částic vzhledem k jejich chování v proudu vzduchu. MMAD se touto metodou určuje na základě tzv. „time-of-flight“ techniky, která zahrnuje měření zrychlení jednotlivých částic (v reakci na zrychlení přes zúženou trysku) vzhledem k jejich hmotnosti a ploše povrchu. Kromě MMAD se určuje i frakce jemných částic (FPF), která charakterizuje procentuální zastoupení částic < 5 μm, což je vhodná velikost částic pro jejich depozici hluboko v plicích. V této práci se použil APS (The Aerodynamic Particle Sizer 3321, TSI, Inc., St. Paul, USA) včetně dispergátoru (Small-scale powder disperser 3433, TSI, Inc., St. Paul, USA) a dilutoru (Aerosol Diluter 3302A, TSI, USA), který ředil vzorek v poměru 20 : 1. Každý vzorek byl změřen 10krát, aby se získaly průměrné hodnoty MMAD a FPF.

### Výsledky a diskuze

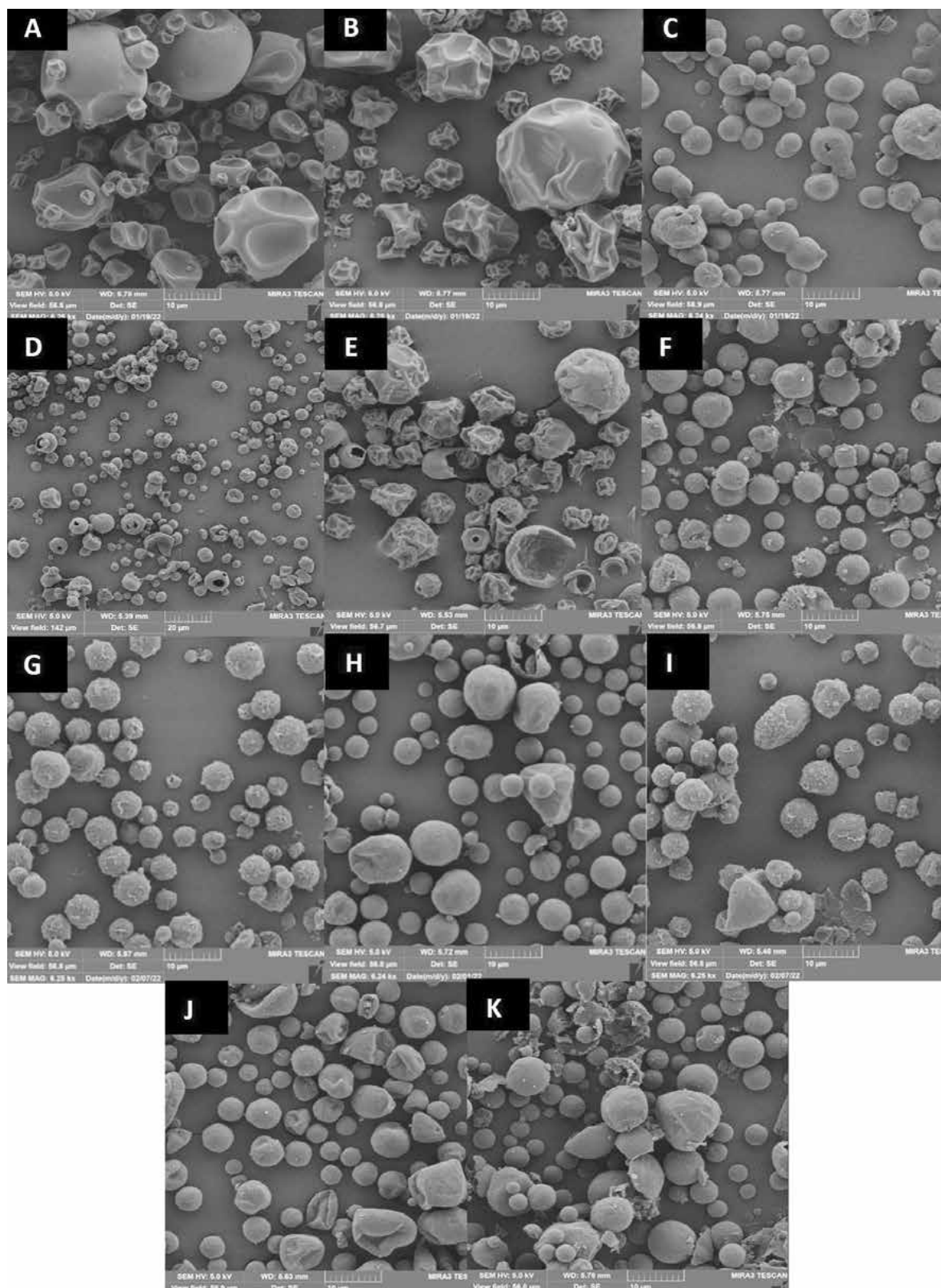
#### Morfologie částic

Morfologie částic, zejména jejich povrch, tvar, pórovitost, orientační velikost nebo také přítomnost aglomerátů byla hodnocena pomocí SEM. Snímky všech šarží jsou na obrázku 1. Ze snímků je možné vyhodnotit měnící se morfologii částic v závislosti na množství obsaženého leucinu. Částice šarží MX\_1 a MX\_2 jsou značně svaštělé a s četnými prohlubněmi. Tyto povrchové nerovnosti jsou však spojovány s lepšími aerosolizačními vlastnostmi a nižšími kohezivními silami mezi částicemi<sup>17</sup>. Se vzrůstající koncentrací leucinu se povrch částic měnil ze svaštělého na hladký a tvar na sférický. Částice šarže MX\_5 vypadají srovnatelně s šaržemi MX\_1 a MX\_2 až na občasný výskyt poškozených částic. Tento efekt je podle Molina et al. přisuzován zvyšující se koncentrací leucinu, který na rozhraní kapky se vzduchem vytváří hydrofobní film. Ten brání úniku vodní páry zevnitř částic a v důsledku toho se uvnitř částice zvyšuje mezifázové napětí mezi pevnou a kapalnou složkou, což vede k rozpínání částice. Jakmile se odpaří veškerá voda, dojde k jeho poklesu, částice se do jisté



míry zhrounutí a vytváří zvrásněný povrch<sup>18)</sup>. U šarží MX\_3 a MX\_4 se vnitřní tlak uvolňuje skrz otvory, a proto je u výsledných částic zachován převážně sférický tvar a hladký povrch. Částice šarže MX\_5 (20 % leucinu) vypadají podobně jako šarže MX\_1 a 2 s tím rozdílem, že se zde vyskytují z velké části částice roztrhané. Čím je koncentrace leucinu vyšší, tím se dá předpokládat, že

je stěna hydrofobního obalu tlustší, a tlak vodních par se tak uvnitř částice zvyšuje<sup>19)</sup>. Tato koncentrace leucinu je tedy pravděpodobně příliš vysoká. Pro navazující fáze experimentu se proto dále volila jeho koncentrace 15 %. Sledování morfologie manitolových šarží bylo stěžejní pro zhodnocení pórovitosti. Se zvyšující se koncentrací porogenu docházelo k vytváření porézněj-



Obr. 1. SEM snímky vzorků: MX\_1 (A), MX\_2 (B), MX\_3 (C), MX\_4 (D), MX\_5 (E), MN\_6 (F), MN\_7 (G), MN\_8 (H), MN\_9 (I), MN\_10 (J), MN\_11 (K) při zvětšení 5000×

ší struktury (oproti srovnávací šarži MN\_6), což je viditelné například u šarže MN\_7 (0,25 % ABC). Podle SEM snímků není povrch manitolových částic tak zvrásněný jako u šarží s maltodextrinem. Tato změna tvaru se přisuzuje tvorbě CO<sub>2</sub> v důsledku rozkladu ABC během sušení a následnému „nafouknutí“ struktury částice<sup>20</sup>. Porézní struktura u ostatních manitolových šarží není navzdory očekávání natolik patrná. Důvodem mohou být ztráty porogenu (ulpění na stěně kádinky, samovolné vypařování při pokojové teplotě) i vzhledem k jeho velmi malému množství. U šarže MN\_10 však byl povrch částic jemně porézní a zvrásněný, tedy výhodný z hlediska aerodynamických vlastností i vzhledem k nižšímu MMAD (5,92 μm). Formulace částic obsahující vyšší koncentraci ABC (MN\_11) sice vedlo k tvorbě hladkých, sférických částic, ty však byly značně poškozené. Pro další experimenty je vhodné použít nižší koncentraci porogenu na úrovni 1 %.

### **Tokové vlastnosti, hustota a pórovitost suchého prášku**

Hodnoty pyknometrické, sypané/setřesné hustoty a pórovitosti mikročástic shrnuje tabulka 3. U maltodextrinových šarží je patrná vzrůstající tendence u pyknometrické hustoty v závislosti na obsahu pevných složek, resp. množství nosiče a leucinu. Se vzrůstajícím množstvím leucinu na úkor maltodextrinu se pyknometrická hustota zvyšovala pravděpodobně v důsledku změny morfologie částic. Nižší hustota je spojena se zvrásněným povrchem částic (MX\_1 a MX\_2), zatímco u hladkých částic převážně sférického tvaru dosahovaly hodnoty pyknometrických hustot až 1,50 ± 0,00 g/cm<sup>3</sup> (MX\_4). Tento trend však neodpovídá hodnotám sypané a setřesné hustoty, u kterých se hodnoty snižovaly v závislosti na zvyšujícím se množství leucinu. S tímto jevem také nekorespondují hodnoty pórovitosti částic, jelikož vyšší pórovitost je spojována s nižší hustotou práškových částic (tab. 3). Se vzrůstající koncentrací leucinu vznikaly poréznější částice, avšak pyknometrická

hustota částic se taktéž zvyšovala. Výsledky manitolových šarží naznačují, že přidání porogenu a zvýšení jeho koncentrace nemělo na výslednou pyknometrickou hustotu částic vliv.

Pro prášky určené pro plicní podání je žádoucí nízká sypaná hustota, a to především z důvodu lepší dispergovatelnosti prášku a s tím spojené vyšší účinnosti po inhalaci. Diametrálně rozdílné hodnoty pyknometrických a sypaných hustot jsou důsledkem rozdílného principu měření. Při měření pyknometrické hustoty dochází k vyplnění vnitřních pórů, ale i prostoru mezi částicemi molekulami helia. Při stejné hmotnosti prášku je tedy získaný objem nižší ve srovnání se sypaným objemem, což vede k rozdílným hodnotám výsledné hustoty. Výsledky měření všech šarží jsou shrnuty v tabulce 3. Snižující se sypaná hustota maltodextrinových koresponduje se zvyšující se pórovitostí. Hodnoty sypaných hustot šarží MN\_6 až MN\_11 byly výrazně vyšší, což souvisí s nižšími kohezivními silami mezi částicemi umožňující jejich lepší dispergaci. Se zvyšující se koncentrací porogenu docházelo ke snižování sypané hustoty, pravděpodobně z důvodu vytváření porézní a lehce zvrásněné struktury částic, což je v souladu s naměřenými výsledky Li et al.<sup>21</sup>). Pro LPP je typické kromě vyšší geometrické velikosti částic také nižší hustota < 0,4 g/cm<sup>3</sup>, což splňují pouze šarže MN\_10 a MN\_11.

Z hodnot sypané a setřesné hustoty se vypočítal HP a IS. Oba z parametrů charakterizují chování prášku ve smyslu tokových vlastností. U nejlépe tekoucího prášku je rozdíl mezi sypanou a setřesnou hustotou zanedbatelný, resp. hodnota HP je podle Českého lékopisu v rozmezí 1,00–1,11 a IS se pohybuje od 1 do 10 %<sup>15</sup>). Zhodnocení charakteru toku připravených částic je taktéž shrnuto v tabulce 3. Jako výborný byl charakter toku stanoven pouze u šarže MX\_1 (HP: 1,08; IS: 7,14 %) a z tabulky je patrné, že se zvyšujícím se zastoupením leucinu ve směsi se charakter toku zhoršoval. I přesto vykazovaly šarže s maltodextrinem na základě naměřených výsledků nejlepší tokové vlastnosti ve srovnání

Tab. 3. Výsledky měření pyknometrické, sypané a setřesné hustoty, HP, IS, charakteru toku prášku a pórovitosti částic

Šarže	Pyknometrická hustota ± SD (g/cm <sup>3</sup> )	Sypaná hustota ρ <sub>0</sub> ± SD (g/cm <sup>3</sup> )	Setřesná hustota ρ <sub>1250</sub> ± SD (g/cm <sup>3</sup> )	Hausnerův poměr	Charakter toku	Index stlačitelnosti (%)	Pórovitost (%)
MX_1	1,33 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,34 ± 0,01	1,08	výborný	7,14	74,52
MX_2	1,39 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,32 ± 0,00	1,20	přiměřený	16,67	76,93
MX_3	1,46 ± 0,01	0,22 ± 0,00	0,30 ± 0,00	1,27	průměrný	25,00	79,45
MX_4	1,50 ± 0,00	0,22 ± 0,00	0,30 ± 0,01	1,39	špatný	28,00	79,97
MX_5	1,48 ± 0,00	0,19 ± 0,02	0,28 ± 0,03	1,47	velmi špatný	32,00	81,11
MN_6	1,45 ± 0,00	0,45 ± 0,00	0,68 ± 0,01	1,50	velmi špatný	33,30	52,96
MN_7	1,43 ± 0,00	0,49 ± 0,03	0,70 ± 0,04	1,42	špatný	29,70	51,39
MN_8	1,45 ± 0,00	0,49 ± 0,00	0,70 ± 0,00	1,43	špatný	30,00	51,63
MN_9	1,44 ± 0,00	0,48 ± 0,01	0,65 ± 0,01	1,36	špatný	26,67	54,71
MN_10	1,42 ± 0,00	0,38 ± 0,02	0,59 ± 0,02	1,58	velmi špatný	36,67	58,57
MN_11	1,43 ± 0,00	0,38 ± 0,02	0,55 ± 0,03	1,45	špatný	30,90	61,56

s ostatními. U manitolových šarží (MN\_6 až MN\_11) byly tokové vlastnosti charakterizovány jako špatné až velmi špatné a závislost přítomnosti či koncentrace porogenu ve směsi nebyla u těchto šarží patrná. Hodnoty HP i IS jsou však z velké míry ovlivněny zacházením s jemným práškem a při měření sypané hustoty také použitím odměrných válců o různých objemech z důvodu nedostatečného výtěžku.

### Velikost částic měřená laserovou difrakcí

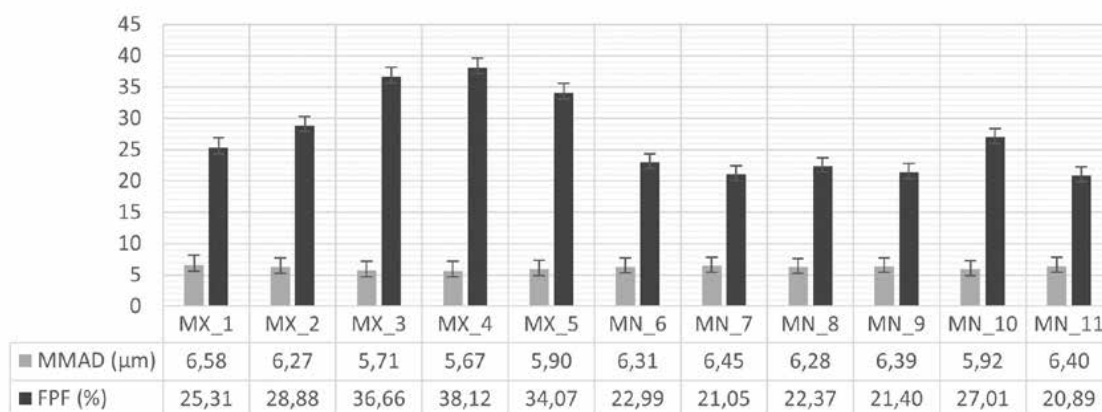
Z měření pomocí laserové difrakce je možné získat údaje zejména o geometrickém průměru částice (MMD), mediánu, modu a percentilních D hodnotách ( $D_{10}$  a  $D_{90}$ ). Výsledky všech měření jsou uvedeny v tabulce 4. Hodnoty MMD se u maltodextrinových šarží pohybovaly v rozmezí od  $6,94 \pm 0,18 \mu\text{m}$  (MX\_4) do  $7,96 \pm 0,11 \mu\text{m}$  (MX\_5). Na základě percentilních D hodnot je také možné zhodnotit, že u 90 % všech částic šarží MX\_1–5 bylo naměřeno MMD <  $12,80 \mu\text{m}$ . Nelze tedy vypořadovat žádný výrazný vliv leucinu na výsledný geometrický průměr naměřených částic. Nejvyšší MMD byl naměřen u šarže MN\_6, což je

způsobeno přítomností dvou různých velikostí částic (viz hodnota  $D_{90}$  a SD). Značí to především přítomnost aglomerátů částic, které se nepodařilo rozrušit ani sonikací před samotným měřením. Aglomeráty byly patrné i u všech ostatních manitolových šarží (MN\_7–11), ačkoliv méně. Z tabulky 4 je také možné vyčíst závislost koncentrace ABC na hodnoty  $D_{10}$  a  $D_{90}$ . Se vzrůstající koncentrací porogenu se hodnota  $D_{10}$  nepatrně zvyšovala a zároveň hodnota  $D_{90}$  snižovala. Dá se tedy říct, že se vrůstající koncentrací porogenu se střední velikost částic spadající do 90 % z celkového souboru zmenšovala.

### Aerodynamická velikost částic

Pomocí přístroje APS se zhodnotila aerodynamická velikost a velikostní distribuce částic včetně hodnoty FPF. Oproti geometrickému průměru stanoveném laserovou difrakcí je MMAD z hlediska inhalačního podání přesnější parametr a napomáhá lépe predikovat, jak se bude daná částice pohybovat v dýchacím traktu.

Hodnota MMAD byla naměřena v rozmezí od  $5,67 \pm 1,47 \mu\text{m}$  (MX\_4) do  $6,58 \pm 1,60 \mu\text{m}$  (MX\_1). Všechny



Obr. 2. Grafické znázornění výsledků měření MMAD a FPF

Tab. 4. Výsledky měření částic laserovou difrakcí

Šarže	Průměrná velikost ± SD* (µm)	Medián ± SD* (µm)	Modus ± SD* (µm)	$D_{10}$ ± SD* (µm)	$D_{90}$ ± SD* (µm)	SD** ± SD* (µm)
MX_1	$7,80 \pm 0,14$	$7,12 \pm 0,13$	$7,21 \pm 0,01$	$3,58 \pm 0,14$	$12,80 \pm 0,20$	$3,89 \pm 0,12$
MX_2	$7,90 \pm 0,06$	$7,28 \pm 0,07$	$7,22 \pm 0,01$	$3,84 \pm 0,04$	$12,69 \pm 0,10$	$3,69 \pm 0,03$
MX_3	$7,00 \pm 0,13$	$6,58 \pm 0,10$	$7,12 \pm 0,46$	$3,92 \pm 0,02$	$10,55 \pm 0,27$	$2,69 \pm 0,11$
MX_4	$6,94 \pm 0,18$	$6,52 \pm 0,13$	$6,33 \pm 0,48$	$3,78 \pm 0,02$	$10,64 \pm 0,44$	$2,80 \pm 0,19$
MX_5	$7,96 \pm 0,11$	$7,35 \pm 0,07$	$7,23 \pm 0,55$	$3,85 \pm 0,02$	$12,80 \pm 0,23$	$3,70 \pm 0,13$
MN_6	$19,58 \pm 4,54$	$7,77 \pm 0,53$	$8,23 \pm 0,61$	$2,94 \pm 0,12$	$26,08 \pm 6,45$	$41,51 \pm 12,02$
MN_7	$7,89 \pm 0,72$	$6,33 \pm 0,77$	$7,19 \pm 0,52$	$2,52 \pm 0,13$	$13,75 \pm 0,83$	$10,24 \pm 6,60$
MN_8	$9,84 \pm 3,35$	$6,00 \pm 0,31$	$6,29 \pm 0,53$	$2,56 \pm 0,18$	$12,99 \pm 2,03$	$21,39 \pm 13,14$
MN_9	$7,45 \pm 0,52$	$6,34 \pm 0,20$	$7,19 \pm 0,01$	$2,66 \pm 0,22$	$12,66 \pm 0,37$	$8,93 \pm 5,91$
MN_10	$8,04 \pm 1,64$	$6,73 \pm 0,57$	$7,17 \pm 0,49$	$3,41 \pm 0,32$	$12,41 \pm 1,59$	$8,73 \pm 6,11$
MN_11	$7,63 \pm 0,88$	$6,52 \pm 0,28$	$7,14 \pm 0,49$	$3,60 \pm 0,31$	$10,92 \pm 0,59$	$11,78 \pm 6,92$

SD\* – směrodatná odchylka tří provedených měření, SD\*\* – směrodatná odchylka stanovená softwarem od střední velikosti částic



ny naměřené výsledky jsou shrnuty na obrázku 2. Lze si povšimnout, že se vzrůstající koncentrací leucinu se hodnota MMAD snižovala. To je patrně způsobeno pokrytím povrchu kapek leucinem vyrovnávajícím povrchové napětí, což vede ke zmenšení jejich velikosti. Ke stejnému výsledku došli i Lamy et al., kteří po přidání leucinu zaznamenali pokles MMAD z hodnoty  $4,9 \mu\text{m}$  na  $3,4 \pm 0,2 \mu\text{m}^{22}$ . Zvýšením koncentrace leucinu z 15 % na 20 % došlo k mírnému vzrůstu MMAD ( $5,90 \pm 1,47 \mu\text{m}$ ), pravděpodobně kvůli přítomným poškozeným částicím. Z obrázku 2 je také patrné, že s nižšími hodnotami MMAD korespondují vyšší hodnoty FPF, které se pohybovaly od 25,31 % (MX\_1) do 38,12 % (MX\_4). Právě nižší hodnota MMAD a vyšší FPF u šarže MX\_4 byla jedním z faktorů, na jejichž základě se vybírala šarže s vhodnou koncentrací leucinu. U částic MN\_6 až MN\_11, kde se jako nosič zvolil manitol, se MMAD pohyboval v rozmezí od  $5,92 \pm 1,32 \mu\text{m}$  (MN\_10) do  $6,45 \pm 1,37 \mu\text{m}$  (MN\_7). Tyto šarže byly hodnoceny především z hlediska vlivu koncentrace porogenu na výsledné hodnoty MMAD a FPF. Pro srovnání byla připravena i šarže bez obsahu ABC (MN\_6) s MMAD  $6,31 \pm 1,38 \mu\text{m}$ . Z výsledků tedy nelze jednoznačně vypočítat vliv porogenu na aerodynamickou velikost částic či hodnoty FPF, které dosahovaly hodnot 20,89 % (MN\_11) až 27,01 % (MN\_10). Právě výsledky šarže MN\_10 (1 % ABC) přispěly k rozhodování o vhodné koncentraci použitého porogenu.

Srovnáním geometrické a aerodynamické velikosti si lze navíc povšimnout, že geometrická velikost je podle výsledků všech šarží vždy vyšší než aerodynamická, což je pravděpodobně důsledkem značné pórovitosti a mírně zvrásněného povrchu částic, který ovlivňuje jeho aerodynamické chování a je jednou ze základních charakteristik LPP<sup>20</sup>.

## Závěr

V rámci experimentu bylo metodou sprejového sušení připraveno a zhodnoceno výše zmíněnými metodami celkem jedenáct šarží mikročástic. Z naměřených výsledků vyplývá, že se zvyšující se koncentrací leucinu se snižovala sypná hustota suchého prášku a zároveň byly naměřeny vyšší hodnoty FPF korelující s nižším MMAD. Nejvhodnější parametry pro podání do plic tedy byly stanoveny u šarže MX\_4 s 15% obsahem leucinu. Tato koncentrace se využila v následujícím kroku, ve kterém se připravovaly a hodnotily částice na bázi manitolu a variabilním množstvím porogenu (ABC). Hodnoty pórovitosti naznačují, že se vzrůstajícím množstvím ABC se pórovitost zvyšovala. Vzhledem k nejnižší hodnotě MMAD z hodnocených šarží ( $5,92 \pm 1,32 \mu\text{m}$ ), vhodné pórovitosti a obecně morfologii částic byla šarže MN\_10 zvolena jako nejvhodnější.

V dalších fázích experimentu dojde k optimalizování složení částic tak, aby splňovaly požadavky pro aplikovatelnost do plic (zejména MMAD < 5  $\mu\text{m}$ ), a vytvořily se tak vhodné matrice k navázání léčiv ze skupiny bronchodilatancií či antibiotik pro terapii plicních onemocnění.

Práce vznikla za podpory projektu SVV MUNI/A/1140/2021.

**Střet zájmů:** žádný.

## Literatura

1. **Hořavová H., Gajdziok J., Vetchý D.** Typy a příprava lipozomálních přípravků pro plicní podání. *Chem. Listy*. 2020; 114, 322–328.
2. **Edwards D., A., Ben-Jebria A., Langer R.** Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. *J. Appl. Physiol.* 1998; 85, 379–385.
3. **Liang Z., Ni R., Zhou J., Mao S.** Recent advances in controlled pulmonary drug delivery. *Drug Discov. Today* 2015; 20, 380–389.
4. **Karas J., Vetchý D., Gajdziok J.** Dry powder particles for pulmonary application. *Chem. Listy* 2022; 116, 28–34.
5. **Gharse S., Fiegel J.** Large porous hollow particles: lightweight champions of pulmonary drug delivery. *Curr. Pharm. Des.* 2016; 22, 2463–2469.
6. **Edwards D. A., Hanes J., Caponetti G., Hrkach J., Ben-Jebria A., Eskew M. L., Langer R.** Large porous particles for pulmonary drug delivery. *Science* 1997; 276, 1868–1872.
7. **Yang Y., Bajaj N., Xu P., Ohn K., Tsifansky M. D., Yeo Y.** Development of highly porous large PLGA microparticles for pulmonary drug delivery. *Biomaterials* 2009; 30, 1947–1953.
8. **Cai Y., Chen Y., Hong X., Liu Z., Yuan W.** Porous microsphere and its applications. *Int. J. Nanomedicine* 2013; 8, 1111–1120.
9. **Kim H. U., Park H. I., Lee J. H., Lee E. S., Oh K. T., Yoon J. H., Youn Y. S.** Pharmaceutical potential of gelatin as a pH-responsive porogen for manufacturing porous poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) microspheres. *Int. J. Pharm. Investig.* 2010; 40, 245–250.
10. **Nasr M., Awad G. A., Mansour S., Al Shamy A., Mortada N. D.** Hydrophilic versus hydrophobic porogens for engineering of poly (lactide-co-glycolide) microparticles containing risedronate sodium. *Pharm. Dev. Technol.* 2013; 18, 1078–1088.
11. **Emami F., Vatanara A., Vakhshiteh F., Kim Y., Kim T. W., Na D. H.** Amino acid-based stable adalimumab formulation in spray freeze-dried microparticles for pulmonary delivery. *J. Drug Deliv. Sci. Tech.* 2019; 54, 101–249.
12. **Hoe S., Matinkhoo S., Boraey M., Ivey J., Shamsaddini-Shahrbabak A., Finlay W. H., Vehring R.** Substitution of L-Leucine with D-Leucine in spray-dried respirable powders for control of *Pseudomonas aeruginosa* infection. In: 19th International Congress. International Society for Aerosols in Medicine. North Carolina USA: 2013.
13. **Schoubben A., Vivani R., Paolantoni M., Perinelli D. R., Gioiello A., Macchiarulo A., Ricci M.** D-leucine microparticles as an excipient to improve the aerosolization performances of dry powders for inhalation. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2019; 130, 54–64.
14. **Prota L., Santoro A., Bifulco M., Aquino R. P., Mencherini T., Russo P.** Leucine enhances aerosol perfor-



- mance of naringin dry powder and its activity on cystic fibrosis airway epithelial cells. *Int. J. Pharm.* 2011; 412, 8–19.
15. **Český lékopis**. 1. vydání. Praha: Grada Publishing 2017.
  16. **Ungaro F., Giovino C., Coletta C., Sorrentino R., Miro A., Quaglia F.** Engineering gas-foamed large porous particles for efficient local delivery of macromolecules to the lung. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2010; 41, 60–70.
  17. **You Y., Zhao M., Liu G., Tang X.** Physical characteristics and aerosolization performance of insulin dry powders for inhalation prepared by a spray drying method. *J. Pharm. Pharmacol.* 2007; 59, 927–934.
  18. **Zhou Q. T., Morton D. A., Heidi H. Y., Jacob J., Wang J., Li J., Chan H. K.** Colistin powders with high aerosolisation efficiency for respiratory infection: preparation and in vitro evaluation. *J. Pharm. Sci.* 2013; 102, 3736–3747.
  19. **Jong T., Li J., Morton D. A., Zhou Q. T., Larson I.** Investigation of the changes in aerosolization behavior between the jet-milled and spray-dried colistin powders through surface energy characterization. *J. Pharm. Sci.* 2016; 105, 1156–1163.
  20. **Chvatal A., Ambrus R., Party P., Katona G., Jójárt-Laczkovich O., Szabó-Révész P., Tsapis N.** Formulation and comparison of spray dried non-porous and large porous particles containing meloxicam for pulmonary drug delivery. *Int. J. Pharm.* 2019; 559, 68–75.
  21. **Li J., Zheng H., Qin L., Xu E. Y., Yang L., Zhang L., Mao S.** In vitro – in vivo correlation of inhalable budesonide-loaded large porous particles for sustained treatment regimen of asthma. *Acta Biomater.* 2019; 96, 505–516.
  22. **Lamy B., Serrano D. R., O'connell P., Couet W., Marchand S., Healy A. M., Tewes F.** Use of leucine to improve aerodynamic properties of ciprofloxacin-loaded maltose microparticles for inhalation. *Eur. J. Pharm. Res.* 2019; 1, 2–11.