

Дослідження процесу ліофілізації та шляхів його оптимізації

Я.П.Лиса, О.Я.Беспалова

Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут», кафедра біомедичної інженерії
Київ, Україна

Метою роботи є розробка шляхів оптимізації процесу ліофілізації біологічних організмів. Проаналізовано процес ліофілізації, визначено основні параметри, які впливають на якість ліофілізації біологічних об'єктів. Проведено аналіз методів контролю етапів ліофілізації. Результати будуть використані для моделювання процесу та його оптимізації.

Ключові слова: ліофільна сушка, сублімація, ліофілізація, попереднє заморожування, первинна сушка, вторинна сушка.

ВСТУП

Термін «ліофілізація» визначається як стабілізуючий процес, при якому речовину спочатку заморожують, а потім кількість води в ній поступово знижується за рахунок сублімації (первинна сушка), а потім за рахунок десорбції (вторинна сушка) до значення, коли біологічний об'єкт не буде підтримувати біологічний ріст та хімічні реакції [15].

Існує декілька назв одного і того ж процесу. Термін «сублімаційна сушка» найбільш часто застосовується у вітчизняній літературі та практиці, однак він не єдиний. Цей процес також визначають як «молекулярна сушка», виходячи з характеру руху пари в порах продукту і в сушильній камері. У медицині та біотехнології його називають «ліофільна сушка», оскільки в результаті виходять ліофільні, тобто легкокорозійні речовини. У закордонній харчовій промисловості часто вживають термін *freeze-drying* (англ.) [1].

Ще в XIX столітті почали велику увагу приділяти дослідженню мікроорганізмів, проте тривалість зберігання одного біологічного

об'єкта була досить короткою, що робило неможливим його детальне вивчення. Були спроби зробити повітряну сушку, проте вони були невдалими — зразок втрачав або свої властивості, або ознаки життєдіяльності.

Саме в цей період і почалось вивчення способу зберігання біологічних об'єктів шляхом їх заморожування. Вважалося, що екстремально низькі температури негативно впливають на процеси життєдіяльності досліджуваного зразка, проте пізніше виявилось, що більше впливають не низькі температури, а процеси рекристалізації.

1890 року німецький гістолог Альтман першим здійснив висушування тканин при низьких температурах та пониженому тиску. Пізніше Бенедикт і Менінг заявили, що можуть висушити біологічні об'єкти при низьких температурах за допомогою хімічного насосу на основі етилового ефіру. Необхідність етилового ефіру в камері для витіснення повітря було замінено Шакем шляхом використання механічних вакуумних насосів. Цікавим є той факт, що ліофільна сушка Шакеля має ті ж самі основні компоненти, що і ліофільні сушки сучасних світових виробників: сушильну камеру, конденсаторну камеру та вакуумні системи [16, 24].

Фізичні основи процесу ліофілізації можна проілюструвати за допомогою діаграми рівноваги фаз для води, яка є системою з одним компонентом H_2O , тому найбільше число фаз, які одночасно можуть перебувати в рівновазі, дорівнює трьом. Ці три фази — рідина, лід і пара (рис. 1) [7].

Число ступенів свободи в цьому випадку дорівнює нулю, тобто не можна змінити ні тиск, ні температуру, щоб не зникла жодна з фаз. Лід, вода і водяна пара можуть існувати в рівновазі одночасно тільки при тиску 0,61 кПа за температури 0,0075°C. Точка співіснування трьох фаз називається потрійною точкою. Якщо підвищувати температуру замороженого матеріалу при

тиску нижче тиску потрібної точки води, буде мати місце процес сублимації [2].

Метою дослідження було розробити методику оптимізації процесу ліофілізації біологічних об'єктів на основі аналізу основних параметрів, які впливають на результат процесу.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

В умовах лабораторії проводили ліофілічну сушку біологічних об'єктів за допомогою приладу LyoQuest-50 (Telstar). На основі порівняльної характеристики основних параметрів, які впливають на якість вихідного зразка, здійснено аналіз шляхів оптимізації процесу.

Ліофілізація застосовується при необхідності тривалого зберігання та консервування різних продуктів біологічного походження, для отримання сухої плазми донорської крові, сухих сироваток і вакцин, у фармацевтичній і харчовій промисловості [10]. У ряді випадків, наприклад, при виробництві сухих легкорозчинних антибіотиків, бактерійних і вірусних препаратів [25], заквасок і ферментів, БАДів і т.п., ліофілізація поки не має альтернативи.

Проте це дуже складний, трудомісний процес. Кожен етап повинен контролюватись, до того ж необхідно враховувати всі параметри, які впливають на процес ліофілізації та подальший процент біологічних об'єктів, що вижили.

Перед початком ліофілічної сушки потрібно врахувати вік культури, умови культивування, тривалість зберігання. Дуже важливим є момент з чистою посуду.

Заморожування є основою для подальшої ліофілізації біологічних об'єктів, оскільки дуже важливим є формування кристалів [28]. По завершенні етапу заморожування основна частина вологи в матеріалі переходить у лід, але при цьому частина зв'язаної води — зазвичай на рівні кількох відсотків — залишається в переохоложеному рідкому стані [5]. На етапі заморожування відбувається фіксація найважливіших властивостей продукту, а подальша сублимація льоду створює пористу структуру (рис. 2). У підсумку якість сублимованих продуктів дуже висока, вони легко регідратуються перед подальшим застосуванням [19]. Проте необхідно враховувати індивідуально для кожного біологічного зразка швидкість та температуру заморожування, тривалість, наявність та склад поживних середовищ [23] для підвищення якості вихідного матеріалу.

Швидкість заморожування є одним з основних параметрів, які впливають на кінцевий ре-

зультат. При повільному заморожуванні живі біологічні об'єкти поступово адаптуються до умов холоду, причому це запобігає їх склеюванню та руйнуванню. У результаті швидкого заморожування утворюються малі кристали льоду, що допомагає при мікроскопічному дослідженні ліофілізованих біологічних об'єктів, проте ускладнює ліофільне висушування [30]. Температура, при якій заморожуються біологічні об'єкти, впливає на розміри кристалів льоду та пористість. Чим глибше охолодження, тим менші кристали льоду утворюються, проте зменшується і пористість біологічного об'єкта (рис. 3). Збільшення рівня охолодження збільшує і нуклеативну температуру (R_p), підвищення якої на кожен градус зменшує час ліофілічної сушки на 3% [29].

У даному випадку потрібно знайти «золоту середину» для забезпечення контрольованого розміру кристалів льоду та достатньої пористості біологічного об'єкта на виході [27].

У зв'язку з тим, що потрібно переносити біологічний матеріал з холодильної камери в ліофілічну сушку, частина продукту розморожується. Тому пропонується два способи вирішення протиріччя: або застосовувати спеціальний пристрій для перенесення біологічного матеріалу в ліофілічну сушку, або проводити попередню заморозку відразу в ліофілічній сушці, підібравши при цьому необхідні умови.

Біологічні продукти заморожуються двома способами, в залежності від складу. Більшість продуктів складаються в основному з води, розчинника та речовин, розчинених у воді, розчиненої речовини. Ці зразки евтен-

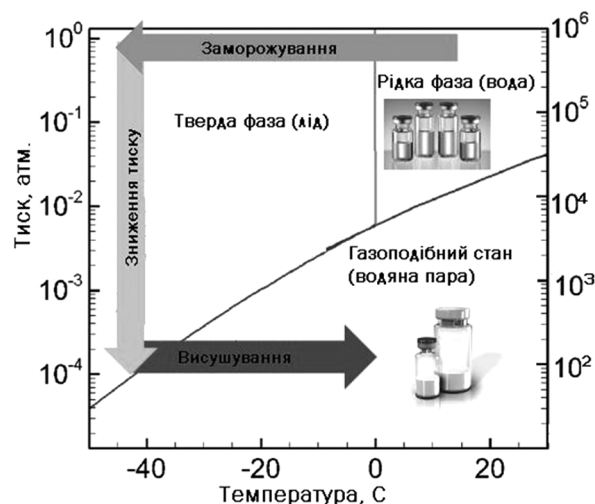


Рис. 1. Термодинамічна карта ліофілізації.

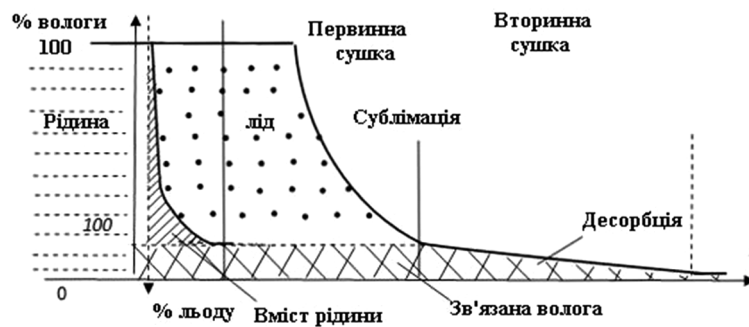


Рис. 2. Принципова схема ліофілізації, де τ – час.

тичні і є сумішами, що замерзають при нижчих температурах, ніж вода, яка їх оточує. Коли водяний розчин охолоджений, у матриці продукту виникають зміни концентрації розчиненої речовини. Оскільки процес охолодження продовжується далі, вода, яка оточує розчинену речовину, збільшує її концентрацію. Саме тому тільки коли вся евентична суміш повністю замерзла, вона є замороженою. Ця температура називається евентичною [14].

Другий тип заморожування – заморожування в скляному посуді. Замість формування евентичної суміші суспензія повністю стає все більше і більше в'язкою зі зменшенням температури. Врешті решт об'єкт перетворюється на тверду речовину в певний момент часу [21].

Після заморозки продукту відбувається фаза первинної сушки, в якій умови повинні бути такими, щоб можна було видалити лід за допомогою сублимації, оминаючи рідку фазу (рис. 1). Це вимагає дуже обережного контролю двох параметрів – температури і тиску [26].

Надзвичайно важливо, щоб температура, при якій проходить ліофілізація, була збалансована між температурою повного замерзання об'єкта та температурою точки максимальної сублимації [6]. Цей баланс є ключовим для оптимальної сушки. Спочатку об'єкт охолоджують до певної температури, а потім поступово піднімають температуру до критичної точки, яка називається потрібною точкою, або критичною точкою. Якщо і далі підвищувати температуру, то лід перетвориться на рідину [22]. Саме тому в даній точці починають знижувати тиск, щоб оминати фазу рідини і перейти в газоподібний стан. Тому вакуумний насос є невід'ємним компонентом системи ліофільної сушки, він використовується для зниження тиску оточуючого середовища навколо об'єкта. Іншим незамінним компонентом системи є конденсор, який використовується для збирання вологи, яка виходить із замороженого

продукту. На ньому конденсуються всі гази, які можуть конденсуватись, як, наприклад, вода та гази, які не можуть конденсуватись, їх виганяє вакуумний насос [3].

Дуже важливо розуміти, що саме завдяки тиску насиченої пари відбувається сублимація молекул води із замороженого об'єкта до конденсора [16]. Молекули мають природну здатність рухатись до колектора, оскільки він має нижчий тиск насиченої пари, ніж дослідний об'єкт. До того ж температура колектора повинна бути значно нижчою від температури об'єкта. Підвищення температури об'єкта має більший вплив на різницю тиску насиченої пари, ніж зниження температури конденсора.

Третім компонентом, незамінним у системі ліофільної сушки, є енергія у формі нагрівання. Майже в десять разів більше енергії потрібно, щоб сублимувати 1 г води із замороженого продукту порівняно із заморожуванням 1 г води [8]. Ось чому необхідно підвищувати температуру об'єкта для підтримки сублимації водяної пари із замороженого продукту. Підігрів повинен дуже обережно контролюватись, оскільки підвищення температури вище температури сублимації може підвищити температуру продукту вище евентичної або температури потрібної точки. Існують два способи підвищення температури. Перший метод – це підігрів полиць, на яких знаходиться об'єкт. Інший ме-

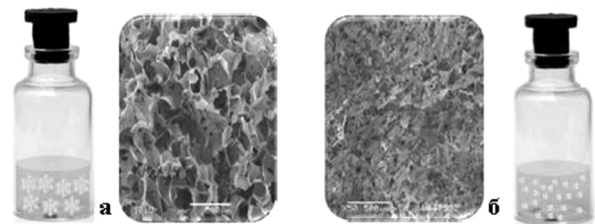


Рис. 3. а) низький рівень охолодження, б) високий рівень охолодження.

год — це підігрів усієї камери. Планується провести досліди з використанням обох способів та перевірити, який найбільш придатний для умов лабораторії.

Завдяки великій тривалості етапу первинної сушки, енергоємності та можливості ушкодження біологічного об'єкта дуже важливим є моніторинг [11], контроль та оптимізація трьох основних параметрів — температури, тиску та енергії у вигляді підвищення температури [9].

Дуже часто використовується термоелемент, який поміщається в декілька флаконів для вимірювання температури продукту під час процесу.

Основні недоліки: інвазивність (елемент вводиться прямо у флакон з біологічним об'єктом); вплив утворення льоду та сублімації на результат; проблеми, пов'язані зі стерильністю продукту; можливість вимірювання температури лише в одній точці.

Новітні розробки дозволяють використовувати «Розумні флакони» [12], які мають ряд переваг: вимірювання внутрішньої, зовнішньої температури та температури полиці; неінвазивне вимірювання.

Існує метод вимірювання температури за допомогою ближнього інфрачервоного світла [13].

Основним недоліком цього методу є те, що вимірювання температури можливо тільки через 50-100 хв. після початку роботи, коли лід почав сублімуватися.

Після первинної сушки увесь лід сублімується, проте залишається зв'язана волога в дослідному зразку. Здається, що продукт уже висушений, але вміст залишкової вологи може бути в межах 7-8% [20]. На етапі вторинної сушки важливо продовжувати висушування при підвищеній температурі [18], щоб зменшити вміст залишкової вологи до оптимальних об'ємів [31]. Цей процес називається ізотермальною десорбцією, оскільки зв'язана волога десорбується з продукту.

Вторинна сушка зазвичай проходить, коли температура дослідного зразка вища, ніж температура оточуючого середовища, але сумісна з чутливістю продукту [4]. Усі інші умови, такі як тиск та температура конденсора, залишаються без змін. Оскільки відбувається десорбція, вакуум повинен бути настільки низьким, наскільки можливо, та температура конденсора настільки низькою, наскільки можливо. Етап вторинної сушки зазвичай займає від 1/3 до 1/2 часу порівняно з часом, який займає первинна сушка [17].

Отже, в процесі вторинної сушки обов'язково необхідно контролювати сталість залишкової

вологи після майже 6-годинної роботи за підвищеної температури та температуру об'єкта, яка повинна бути вище температури навколишнього середовища.

За високої температури та низької залишкової вологи неможливо нашкодити біологічному об'єкту, який піддається ліофілізації.

ВИСНОВКИ

Технологія сублімаційної сушки має ряд переваг: максимальний ступінь збереження (до 90%), дозволяє запобігти розкладанню та дегенерації біологічного об'єкта, найбільш оптимальна для продуктів з високою чутливістю та високим ступенем окислення; мала питома вага (близько 1/5-1/10 ваги неліофілізованих речовин); низький процент вмісту вологи, тому ліофілізація оптимально підходить для швидкорозчинних лікарських препаратів, а також продуктів, призначених для тривалого зберігання; формування рихлої та комірчастої структури продукту, який матиме неперевершені властивості швидкого розчинення та регідратації, а також відновлення властивостей при додаванні води; мала вірогідність виникнення чужорідних речовин у продукті; рівномірний розподіл неорганічних солей всередині продукту в процесі ліофілізації, що запобігає їх затвердінню; завдяки герметичності приладу виключається можливість забруднення об'єкта чужорідною мікрофлорою; можливість зберігання ліофілизованого продукту в нерегульованих температурних умовах.

Проте для досягнення основних цілей ліофільної сушки біологічних об'єктів необхідно чітко контролювати всі етапи процесу: попереднє заморожування, первинну сушку та вторинну сушку. До основних параметрів на етапі заморожування належать глибина і швидкість заморожування, на етапах первинної та вторинної сушки — температура продукту, температура конденсора, вакуум, тиск та енергія.

ЛІТЕРАТУРА

1. Антипов С.Т. Исследование процесса сублимационного обезвоживания жидких материалов с многократным использованием теплоты фазовых переходов / С.Т.Антипов, Г.И.Мосолов, М.Н.Сидоров // Межд. научно-техн. конф. «Прогрессивные технологии и оборудование для пищевой промышленности»: тез. докл. — Воронеж, 1997. — С. 155-158.
2. Камовников Б.П. Вакуум-сублимационная сушка пищевых продуктов (основы теории, расчет и оптимизация) / Б.П.Камовников, Л.С.Малков, В.А.Воскобойников. — М.: Агропромиздат, 1985 — 288 с.

3. Лебедев Д.П. Теплометрические основы оптимизации параметров сублимационной сушки в вакууме / Д.П.Лебедев, О.А.Герашенко, Е.Ф.Андреев // ИФЖ. — 1973. — Т. 24, №6. — С. 1059-1064.
4. Пушкаръ Н.С. Теория и практика криогенного и сублимационного консервирования / Н.С.Пушкаръ, А.М.Белоус, У.Д.Цветков. — К: Наукова думка, 1984. — 264 с.
5. Семенов Г.В. Модель и аналитическое описание процесса сублимационной сушки полидисперсных материалов. — Вестник Международной академии холода. — 2003. — Вып. 2. — С. 37-41.
6. Семенов Г.В. Тепломассообмен в промышленных процессах вакуумного сублимационного обезвоживания с учетом условий контактирования / Г.В.Семенов, М.С.Булкин, Л.Э.Меламед, А.И.Тропкина // Вестник Международной академии холода. — 2010. — Вып. 2. — С. 25-33.
7. Alexeenko A. Fluid Dynamic Modeling of Lyo technology: Qualifying and Reshaping the Design Space. Presented at the International Society of Lyophilisation — Freeze Drying (ISLFD) Mid-West Chapter Meeting. Chicago, USA. — 2012.
8. Barbaree J.M., A. Sanchez. Cross-contamination during lyophilization // Cryobiology. — 1982. — Vol. 19. — P.443-447.
9. Barresi A. Monitoring of the primary drying of a lyophilization process in vials // A.Barresi, R.Pisano, D.Fissore et al. // Chem. Eng Process. — 2009. — Vol. 48. — P. 408-423.
10. European Patent Application 92202581.1. Continuous freeze-drying apparatus / R.Bruttini. — Date of filling 20.11.1992; date of publication 16.06.1993. — Bulletin 93/24.
11. European Patent Application 1903291A1. Method and system for controlling freeze-drying process / S.Velardi, A.Barresi. — Date of filling 19.09.2006; date of publication 26.03.2008. — Bulletin 2008/13.
12. Gieseler H. Use of manometric temperature measurement (MTM) and SMART freeze dryer technology for development of an optimized freeze drying cycle / H.Gieseler, T.Kramer, M.Pikal // PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology. — 2005. — Vol. 96 (12). — P. 3402-3418.
13. Hafeez Y.M. Effect of freeze-drying and gamma irradiation on biomechanical properties of bovine pericardium / Y.M.Hafeez // Cell and Tissue Banking. — 2005. — Vol. 6. — P. 85-89.
14. Han B. Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing / B.Han, J.C.Bischof // Cryobiology. — 2004. — Vol. 48. — P. 8-21.
15. Harris R.J.C. Ed. Biological Applications of Freezing and Drying. — New York: Academic Press, 1954.
16. Jennings T.A. Lyophilization: introduction and basic principles // Englewood. — CO: Interpharm Press, 1999. — P. 624.
17. Nail S. A design Space Approach to Freeze Dry Cycle Development and Optimization. Presented at the International Society of Lyophilisation / S.Nail // Freeze Drying (ISLFD) Mid-West Chapter Meeting. — Chicago, 2012.
18. Nail S. The effect of chamber pressure on heat transfer in the freeze-drying of parental solutions / S.Nail // Journal of the Parental Drug Association. — 1980. — Vol. 34. — P. 358-368.
19. Ozkavukcu S. Cryopreservation: Basic knowledge and biophysical effects / S.Ozkavukcu // Journal of Ankara medical school. — 2002. — Vol. 24, №4. — P. 187-196.
20. Patel S. Determination of the End Point of Primary Drying in Freeze-Drying Process Control / S.Patel, T.Doen, M.Pikal // AAPS PharmSciTech. — 2010. — Vol. 11(1). — P. 73-84.
21. Pikal M. The Collapse Temperature in freeze drying: Dependence on Measurement methodology and rate of water removal from the glassy phase / M.Pikal, S.Shah // Journal Pharmaceutical Science. — 1990. — Vol. 62. — P. 165-186.
22. Rindler V. Freeze-drying of red blood cells at ultra-low temperatures / V.Rindler, S.Luneberger, P.Schwindke et al. // Cryobiology. — 1999. — Vol. 38. — P. 2-15.
23. Rowe T.W.G. Freeze-drying of biological materials: some physical and engineering aspects / T.W.G.Rowe // Current Trends in Cryobiology. — 1970. — P. 61-138.
24. Patent US 6543155 B2. Freeze-dried product and process and apparatus for producing it / A.Horigane; assignee National Agricultural Research Organization. — Filed 20.09.2002; date of patent 08.04.2003.
25. Patent US 4295132. Lyophilization of bacteria / Sandine E.William, R.Vedamuthu Ebenezer; assignee MicroLife Technics, Inc. — Filed 17.07.1978; date of patent 27.05.1980.
26. Patent US 6848196 B2. Method of monitoring a freeze-drying process / M.Brulls; assignee AstraZeneca AB. — Filed 17.04.2001; date of patent 01.02.2005.
27. Patapoff Thomas W. The importance of freezing on Lyophilization cycle development / Thomas W.Patapoff, David E.Overcashier // BioPharm. — 2002. — Vol. 2. — P. 16-21.
28. Shalav E.Yu. Solid-liquid state diagram of the water-glycine-sucrose system / E.Yu.Shalav, A.N.Kanev // Cryobiology. — 1994. — Vol. 31. — P. 374.
29. Shon M. Understanding & Optimizing the Freeze Drying Cycle Utilizing SMART™ & CONTROLLO™ Nucleation On-demand Technology. Presented at the International Society of Lyophilisation // Freeze Drying (ISLFD) Mid-West Chapter Meeting. — Chicago, 2012.
30. Van Wagtendonk-De Leeuw A.M. Comparison of the efficacy of conventional slow freezing and rapid cryopreservation methods for bovine embryos / Van Wagtendonk-De Leeuw A.M., Den Daas J.H.G., Kruij P.T.A.M., Rall W.F. // Cryobiology. — 1995. — Vol. 32. — P.1 57-167.
31. Willemer H. Measurement of temperature, ice evaporation rates and residual moisture contents in freeze-drying / H.Willemer // Dev. Biol. Stand. — 1991. — Vol. 74. — P. 123-136.

Я.П.Лыся, Е.Я.Беспалова. Исследование процесса лиофилизации и путей его оптимизации. Киев, Украина.

Ключевые слова: лиофильная сушка, сублимация, лиофилизация, предварительная заморозка, первичная сушка, вторичная сушка.

Целью исследования было разработать методы оптимизации процесса лиофилизации биологических организмов. Проанализирован процесс лиофилизации, определены основные параметры, которые влияют на качество лиофильной сушки биологических объектов. Проведен анализ методов контроля этапов лиофилизации. Результаты будут использованы для моделирования процесса и его оптимизации.

Ya.P.Lysa, O.Ya.Bespalova. Investigation of the lyophilization process and ways to optimize. Kyiv, Ukraine.

Key words: freeze-drying, sublimation, lyophilization, pre-freezing, primary drying, secondary drying.

The aim of work is development ways of lyophilization process optimization. Freeze-drying process and its main parameters that affect the quality of the freeze-drying of biological objects have been analyzed. The methods of freeze-drying stages control have been studied. The results will be used for modeling and optimization of process.

Надійшла до редакції 21.07.2013 р.