

## OSNOVE LIOFILIZACIJE (I del)

Bojan Povh<sup>1</sup>, Inštitut za elektroniko in vakuumsko tehniko, Teslova 30, 1000 Ljubljana

### Basics of freeze drying (Part I)

#### ABSTRACT

Freeze drying removes water from biological and organic materials which heat would damage, but preserves structure and composition. It is a slow process consuming about 3 times more energy than conventional drying so it is used mainly for delicate, relatively high value materials. In this paper the overall view of the physical and technical processes that take place during freeze drying is presented.

#### POVZETEK

Liofilizacija je postopek, s katerim odstranimo vodo iz bioloških in organskih snovi, ki bi jih s segrevanjem poškodovali, hkrati pa ohranimo njihovo strukturo in sestavo. Postopek je počasen in porabi 3-krat več energije kot konvencionalno sušenje, zato ga uporabljamo le za občutljive in drage produkte. V prispevku podajam splošen pregled fizikalnih in tehničnih osnov liofilizacije.

### 1 Uvod

Večina produktov biološkega izvora, še posebej tistih, ki so namenjeni za medicinske in farmacevtske aplikacije, je zelo pokvarljiva, če jim ne odtegnemo ali imobiliziramo vode. Ze dolgo je znana možnost neomejenega konzerviranja z globokim zamrznjenjem, vendar je ta metoda za dolgotrajno skladiščenje, transport in distribucijo zelo neprikladna. Popolnoma nesprejemljiva je npr. za vaccine, antibiotike in krvne frakcije, ki se pošiljajo po vsem svetu. Prastaro je tudi sušenje živil na zraku z eventualnim ogrevanjem, ki pa produkte precej spremeni, jim zmanjša biološko vrednost in odvzame naravni videz.

Tehnika liofilizacije združuje prednosti obeh navedenih postopkov in omogoča skoraj neomejeno hranjenje kar najbolj spremenljivih snovi (kot so: vaccine, hormoni, tkivni ekstrakti, naravni organski sokovi, mikroorganizmi, živalska in človeška tkiva) pri normalnih temperaturah okolice /1-7/. Treba jih je le dovolj zaščititi pred vlago in kisikom iz zraka ter pred svetlobo. Bistvo procesa je, da v prvi fazi produkt s primerno hitrostjo ohlajanja globoko zamrznemo, da se voda izloči v obliki drobnih lednih kristalov, v drugi pa pustimo led sublimirati pod znižanim tlakom v vakuumu. Na mestu lednih kristalov ostanejo le še pore. Zato pravilno liofilizirana snov pri ponovnem dodatku vode (pred uporabo) le-to hlastno sprejme ali se v vodi hitro raztopi. Odtod izraz "lioilizirati", skovanka grškega izvora, ki pomeni spraviti snov v stanje, da se rada razpusti (v vodi). Drugi nazivi postopka, ki označujejo metodo, ne rezultata, so cryodessiccation, freeze drying ter Gefriertrocknung.

Liofilizacijo so začeli uporabljati v laboratoriju že pred 1. svetovno vojno, in sicer za konzerviranje serumov, virusa stekline, bakterij in podobno. V večjem merilu sta jo prva uporabila Flosdorf in Mudd okrog 1935 za sušenje človeške krvne plazme, ki se je industrijsko razmahnilo med 2. svetovno vojno. Tedaj so začeli uporabljati liofilizacijo tudi za izdelavo antibiotikov in po

vojni je bila ta tehnika že dokaj razširjena v industriji za medicinsko, veterinarsko in farmacevtsko področje. Sušili so tudi že hormone, vaccine, humano mleko za občutljive otroke. V naslednjih letih se je postopno uveljavila za konzerviranje najrazličnejših snovi in bakterijskih kultur ter prodrla tudi na številna druga področja, npr. v prehrabno industrijo, kemično industrijo in celo nuklearno tehniko. Na osnovi izkušenj z drugimi vakuumskimi tehnologijami, posebno v metalurgiji, so začeli graditi velike tovarne za liofilizacijo živil. Ta je lahko rentabilna le pri dovolj velikih napravah, v poštev pa pride predvsem za dražja hranila ali za specifične potrebe (vojska, kampi). Obdelavni volumni so se tako kmalu povečali od nekaj cm<sup>3</sup> na več deset m<sup>3</sup>. Vzporedno se je povečala kompleksnost instalacij in začeli so graditi tudi popolnoma avtomatske naprave, delujoče v zveznem režimu.

Obdelava transplantacijskih tkiv, plazme, vaksin, bakterijskih kultur in antibiotikov pa se še vedno izvaja v majhnih šaržah, sušenje je zaradi večje previdnosti bolj dolgotrajno. Tu gre predvsem za kvaliteto in zanesljivost, ne pa za znižanje energijskih stroškov ali trajanja cikla. Važno pa je natančno poznanje optimalnih razmer pri sušenju in tehnična izpopolnjenost naprav, da lahko brez napak zagotovimo zahtevane parametre.



Slika 1: Naprava za liofilizacijo

<sup>1</sup> Mag. Povh je upokojeni sodelavec Inštituta za elektroniko in vakuumsko tehniko iz Ljubljane, ki je pred leti v okviru raziskovalne naloge obdelal to področje. Tekst je za objavo priredil urednik Vakuumista.

Ves proces liofilizacije obsega naslednje stopnje: priprava produkta za sušenje, zamrzovanje, primarno sušenje - sublimacija ledu v recipientu pod znižanim tlakom, sekundarno sušenje desorpcija preostale vlage; hermetično pakiranje; k temu lahko dodamo še rekonstitucijo snovi pred uporabo z dodajanjem ustrezne količine vode. Postopki so kritično odvisni od produkta. Zato je treba prej določiti osnovno sestavo začetne raztopine, ustrezno hitrost zamrzovanja in minimalno temperaturo pri njem, strukturo in temperaturo produkta med sublimacijo, potrebno trajanje sekundarnega sušenja in procent residualne vlage, ki ga je treba doseči, ter potrebno kvaliteto končnega pakiranja.

Nekaj osnovnih razlogov za sušenje iz zmrznjenega stanja:

1. Če sušimo pod znižanim tlakom iz tekoče raztopine, bo trdne sestavine odnašal s seboj parni tok (višji parni tlak - močnejši tok).
2. Če sušimo iz nezamrznjenega (ali nepopolno zamrznjenega) stanja, se bo fizična struktura produkta razrušila zaradi krčenja, ki je posledica delovanja površinske napetosti preostale raztopine; to pokvari videz in onemogoči rehidracijo in rekonstitucijo v originalno obliko.
3. Pri izhlapevanju iz nezamrznjenega stanja postaja koncentracija raztopljenih snovi v preostali vodi vse večja, pri tem so pa občutljive organske molekule in celične sestavine podvržene neobrnljivim spremembam. Ko sušimo iz zamrznjenega stanja, do tega ne more priti; samo zamrzovanje je lahko veliko hitrejše, torej je manj časa za spremembe, ki pri nizkih temperaturah tudi počasneje potekajo.

Pri takem sušenju se npr. v hranilih ohranja notranja zgradba in videz, v veliki meri ostanejo v produktu tudi hlapne komponente oz. arome (zaradi adsorpcije na ogromni notranji površini, a tudi zaradi uporabe nizke temperature). Vitamini in esencialne maščobne kisline se ohranijo v originalnem stanju, proteini se ne denaturirajo, kot bi se sicer. Tako se optimalno ohranijo začetne lastnosti preparata, npr. aktivnost fermentov ali pri bakterijah zmožnost razmnoževanja.

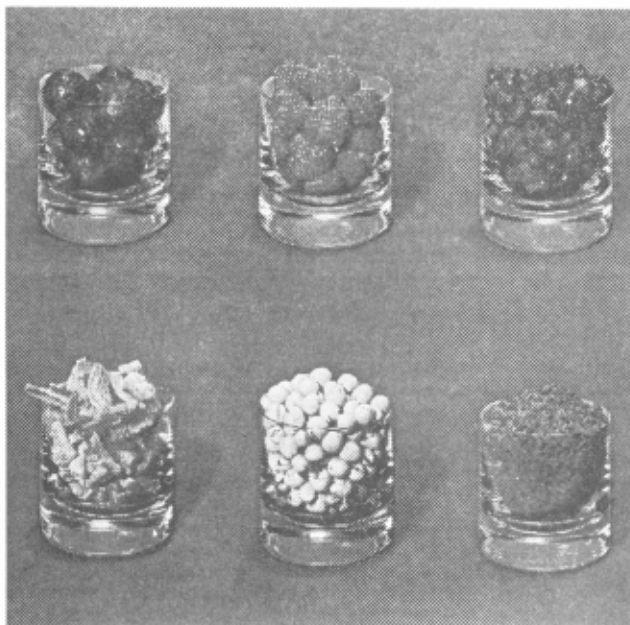
Prednost liofiliziranih produktov je tudi, da prenašajo velike spremembe temperature pri transportu, hranimo jih pa lahko pri temperaturi okolice tudi v tropskih krajih. So veliko lažji od originalnega produkta, praški pa zavzemajo tudi manjšo prostornino.

## 2 Možnosti uporabe liofilizacije

Liofilizacija je v prvi vrsti potrebna za konzerviranje temperaturno občutljivih produktov, katerih bistvene in želene lastnosti se izgubijo, če jih obdelamo na drug način. Glavna področja so torej farmacija, biologija in medicina, vendar pridejo naprave za liofilizacijo v poštev tudi drugje /8/. Uporabne so npr. na geoloških inštitutih za sušenje vzorcev zemlje in mulja; na botaničnih inštitutih za mikroskopske preiskave nestabilnih sestavin rastlin, za raziskave fermentov, kloroplaste, rastlinska semena, rastlinske viruse, zelišča in gobe za demonstracijske namene. V kemijskih inštitutih se liofilizacija uporablja za sušenje občutljivih spojin, ohranjanje radikalov, sušenje v odsotnosti kisika, proizvodnjo snovi z veliko notranjo površino.

V laboratorijskem okviru so poskušali uporabiti liofilizacijo za snovi, pri katerih igra bistveno vlogo velikost površine ali površinska aktivnost /9/. Pri barvilih, katalizatorjih in adsorbentih lahko s tem preprečimo aglomeracijo, zlivanje in sintranje. Sem spada tudi liofilizacija vzorcev blata in usedlin, pri katerih želimo preprečiti aglomeracijo med sušenjem (istočasno konzerviramo eventualne vključke bioloških snovi). Nekatere gume in sintetični geli se po liofilizaciji hitro raztopijo v vodi in tako se izognemo daljšemu času rehidracije pred uporabo. Za radioaktivne snovi ima liofilizacija prednost pred navadnim sušenjem, da pri vrenju ne pokajo mehurji in para ne odnaša s seboj toliko snovi; še za več dekad to zmanjšamo, če dodamo nekaj velikomolekularne, površinsko zelo aktivne snovi, ki utrdi strukturo suhe snovi.

V industriji se je močno uveljavilo liofiliziranje živil za posebne potrebe ali na komercialni osnovi. Tu obratujejo tudi največje instalacije. Sušijo tekoče produkte (napitki), pastaste (makaroni, sir ipd.) ali v kosih (zrezki, sadje, povrtnina). Cena je sprejemljivejša za posebna hranila, kot instant kava in čaj, začimbe, gobe, koncentrirani sadni sokovi. V poštev pridejo tudi suhe juhe, otroška in dietna prehrana. Sušijo še meso, ribe in drugo hrano iz morja, sadje, listnato zelenjavo, perutnino, mlečne proizvode in druge rastlinske in živalske surovine. Cena proizvodnih stroškov tu omejuje širšo uporabo. Hrana, ki vsebuje veliko maščob ali sladkorja, se pa da le redko dobro liofilizirati.



Slika 2: Liofilizirani produkti

V tovarnah mlečnih izdelkov izdelujejo mleko v prahu, mlečne produkte, sušijo jogurt in skuto, poleg tega izdelujejo bakterijske preparate, sušijo mlečnokislinske bakterije. Liofilizacijo uporabljajo v centrih za zbiranje humanega mleka. Ta uporaba je že sorodna farmaceutski, kjer cena ne igra tako omejujoče vloge.

V farmacevtski proizvodnji se je aplikacija liofilizacije močno uveljavila. V poštev pride za mnoge preparate, ki so nestabilni v raztopini. Konzervirajo razne občutljive produkte kot antibiotike (npr. streptomycin, penicilin, ampicilin), vitamine, hormone, encime,

rastlinske ekstrakte, jetrne ekstrakte za parenteralno rabo, beljakovinske preparate. Z liofilizacijo rešujejo mnoge probleme farmacevtske tehnologije. Tako je bila včasih težavna priprava injekcij kloramfenikola zaradi zelo slabe topljivosti v vodi, z liofilizacijo pa so dosegli hkrati topljivost in stabilnost. Če raztopina vsebuje zelo malo zdravila, je treba dodati nevtralno snov, ki rabi kot polnilo ali opora (npr. glikokol, laktoza, sledove beljakovin). Tako je uspelo posušiti celo oljne emulzije v vodi, produkt se pa pri dodatku vode takoj regenerira v originalno emulzijo.

Med preparati biološkega porekla sta pomembni dve skupini: neživi materiali in preparati, v katerih so imunogeni in terapevtski agensi živi mikroorganizmi. V prvo spada krvna plazma in serum, ki ju lahko hitro sušimo, brez posebne nevarnosti pregretja. To velja bolj ali manj tudi za antigene, toksoidne ali anatoksinne za izdelavo nekaterih vakcin, antitoksine (npr. proti davici) in drugo.

Pri drugi skupini je treba paziti, da postopek preživi čim večji odstotek celic. Tako liofilizacijo uporabljajo, recimo, na mikrobioloških, bakterioloških in viroloških inštitutih za konzerviranje laboratorijskih kultur mikroorganizmov, skladiščenje določenih sevov bakterij, virusov, bakteriofagov praživali, gliv, sestavin gojišč za mikroorganizme, celic toplokrvnih živali, eritrocitov, spermatozoidov, celičnih kultur, človeških ledvičnih celic. Na tej osnovi tudi industrijsko pripravljajo oslabiljene vakcine ali terapevtske preparate, v katerih je določeno število živih mikroorganizmov sestavni del njihove biološke aktivnosti (npr. *Lactobacillus bifidus*, namenjen za enteralno uporabo pri črevesnih infekcijah).

Nadaljnji podobni pripravki za humano medicino so cepiva proti kozam, influenci, rumeni mrzlici in koleri /8/. Članek poroča o uspešni stabilizaciji vakcine BCG z liofilizacijo, ki zdrži več tednov pri temperaturi do +37°C in ima prednost pred tekočo suspenzijo med drugim tudi zato, ker je omogočena standardizacija. Tudi pri nas so že pred leti začeli izdelovati suho živo vakcino iz oslabiljene kulture virusa ošpic; aktivnost za uporabo pripravljenih suspenzij se ni bistveno razlikovala od tistih iz zamrznjenih kontrolnih vzorcev. Sicer pa farmacevtska industrija izdeluje tudi za veterino razna cepiva na osnovi liofiliziranih virusov in bakterij.

Krvne banke liofilizirajo poleg same plazme razne plazemske frakcije, kot so fibrinogen, antihemofili, albumin, gamaglobulin, anti-D-imunoglobulin, protitelesa. Pri tem ima liofilizacija pomen tako za terapevtske namene kot tudi za diagnostične, saj lahko serume, plazmo in njene frakcije uskladiščimo za referenčne namene. Z liofilizacijo lahko uspešno pripravljajo biološke standarde.

Liofilizacija se uporablja tudi v sodni medicini, nadalje v inštitutih za patologijo in anatomijo in sicer na področju histologije, histokemije, imunohistologije, za tkivne kulture, raziskave raka, elektronsko mikroskopijo, mikroradiografijo in mikrofiziologijo. Tako pripravljajo vzorce bioloških tkiv za citološke in citokemične preiskave; po hitri ohladitvi in osušitvi jih npr. zalijejo s parafinom. Za svetlobno in elektronsko mikroskopijo živalskih celic in tkiv je potrebna zelo hitra in globoka

zamrznitev, po osušitvi pa jih impregnirajo, fiksirajo ali barvajo in zalivajo pod vakuumom v parafin ali umetno snov; pred samo preiskavo jih šele režejo z ultramikrotomom. Za te namene obstajajo univerzalne laboratorijske naprave /8/, v katerih je možno poleg hlajenja in sušenja tudi ionsko jedkanje, naprevanje kovin ali ogljika, naprševanje, rezanje majhnih objektov, ki se nato raziskujejo v presevnem ali vrstičnem elektronskem mikroskopu, z mikrosondo ali avtoradiografsko.

Pomembno področje uporabe liofilizacije je na kirurških klinikah za konzerviranje transplantacijskega materiala (npr. arterij, kosti, živčnega tkiva, kože, mišičnih ovojnic in ovojnic centralnega živčevja). Na oftalmoloških klinikah pride v poštev liofilizacija očesne steklovine ali roženice. Kirurški transplantacijski material liofilizirajo in hranijo tudi posebne tkivne banke, ki lahko predelujejo tudi embrionalni ekstrakt in frakcije plazme /8/. Sušenje posameznih tkiv, ki je danes že v rabi, kaže na možnost, da se bodo nekoč dali konzervirati tudi celi organi v suhem stanju /9/. Mogoče bi s tem celo zmanjšali specifične reakcije zavračanja tujih beljakovin.

Nadaljnje širjenje uporabe liofilizacije je pričakovati z nadaljnjim razvojem samih produktov, a tudi razvoj postopkov še ni končan. Tako obstaja vrsta farmacevtsko in kemično zanimivih produktov, ki v vodi niso topni ali pa so zelo slabo. Liofilizacija z odstranjevanjem anorganskih ali organskih nevodnih snovi utegne dobiti velik pomen /9/. Zmrzišče ustreznih topil je precej nižje v primerjavi z vodo, tlaki višji, nekatera topila pa so eksplozivna ali močnega vonja (NH<sub>3</sub>). Možna uporaba je npr. sublimacijsko sušenje v vodi netopnih maščob ali lipoidov, snovi za okus in dišav ali farmacevtsko biološko aktivnih snovi.

### 3 Sklep

Sušenje iz zamrznjenega stanja je potrebno predvsem tam, kjer želimo za daljšo dobo konzervirati občutljive snovi biološkega izvora ali celo žive mikroorganizme, celice in tkiva. Tako se izognemo neprikladnemu in včasih nemogočemu hranjenju pri zelo nizkih temperaturah ali pa drugačnim obdelavam, ki bi preparate uničile ali jim odvzele bistvene lastnosti. Tako sušenje je sicer potrebno tudi, kadar želimo ohraniti strukturo trdnega ogrodja snovi ali kadar se zahteva, da pri sušenju izgubljammo kar najmanjše sledove suhe snovi.

### 4 Literatura

- /1/ M. Heldner, *Vakuum in Forschung und Praxis*, 4 (1997) 281-288
- /2/ L. Rey, *Le Vide*, 98, 1962, 134
- /3/ L. Rey, *Le Vide*, 101, 1962, 428
- /4/ R.V. Hughson, *Chem. Eng.*, 20, 1964, 155
- /5/ J.F. Maguire, *Vacuum*, 17, 1967, 631
- /6/ J.N. Dalglish, *Food Manufacture*, April 1962, 148
- /7/ Katalog firme Edwards, 1997-1998, 267-268
- /8/ Prospektni material forme Lybold
- /9/ H. Willemer, *Sonstige Anwendung und die künftige Entwicklung der Gefriertrocknung* Lehrgangshandbuch Gefriertrocknung, DAG Vakuum, Düsseldorf, 1972
- /10/ J. Ungar et al, *Brit. Med. J.*, Oct. 27, 1962, 1086