

OSNOVE LIOFILIZACIJE (III. del)

Bojan Povh¹, Inštitut za elektroniko in vakuumsko tehniko, Teslova 30, 1000 Ljubljana

Basics of freeze drying (Part III)

ABSTRACT

In the third part of the article various techniques of freezing and drying are explained and apparatuses are briefly reviewed. Various procedure modes and equipment realizations for freeze-drying of biological materials are reviewed. Design of main complexes for experimental and industrial plants is described.

POVZETEK

V tretjem delu prispevka opisujemo različne tehnike zamrzovanja in sušenja. Podrobno predstavljamo različne izvedbe postopkov in naprav za sušenje bioloških snovi v zamrznjenem stanju. Opisana je konstrukcijska zasnova glavnih sklopov eksperimentalnih in industrijskih naprav.

1 Izvedbe naprav in oprema /2-6/

V prejšnji številki smo predstavili fizikalne osnove liofilizacije. Tokrat si bomo na kratko ogledali tehnične izvedbe dveh glavnih faz liofilizacije: zamrzovanja in sušenja s sublimacijo ledu. Shema liofilizatorja, ki omogoča vse variacije pri nastavljanju zamrzovalnih in sušilnih okoliščin, je prikazana na sliki 1. V drugem delu prispevka bomo opisali tudi različne metode, ki se uporabljajo za kontrolo procesov liofilizacije. Zadnji del prispevka pa je posvečen opisu postopkov sterilizacije naprav za liofilizacijo.

1.1 Zamrzovanje

Glede na mesto razlikujemo zamrzovanje v ločeni napravi ali v samem sušilniku. Ločeno je predvsem pri majhnih laboratorijskih napravah ali pa pri največjih za živilsko industrijo. Za farmacevtsko proizvodnjo pa je zamrzovanje navadno na istih ploščah kot potem sušenje. Glede na metodo pa imamo naslednje glavne možnosti: i) izparevalno zamrzovanje, ii) zamrzovanje v hladilni kopeli, iii) zamrzovanje na hlajenih ploščah. Delitev je možna tudi po metodi ustvarjanja mraza. Tu le omenimo termoelektrično hlajenje /1/, primerno za majhne in tanke vzorce tkiv. Pri improviziranih majhnih laboratorijskih napravah se lahko uporabljajo mešanice alkohola in suhega ledu, ki dajejo temperature v področju od -20 do -80°C. Podobno se uporablja potapljanje v tekoči dušik, je pa to energijsko potratna metoda in primerna le za majhne količine. Vsi drugi liofilizatorji, od laboratorijskih do industrijskih, pa uporabljajo kompresorske hladilne naprave. Le pri velikih industrijskih napravah (npr. za živilsko industrijo) uporabljajo tudi absorpcijske naprave na amoniak. Za naprej bomo upoštevali samo možnost kompresorskega hlajenja.

a) Zamrzovanje z izparitvijo

Zamrzovanje z izparitvijo dela vode iz tekoče raztopine pod vakuumom se uporablja za ampule, včasih tudi za

bučke z malo vsebine. Ko izpari okrog 20% vode, ostanek zamrzne zaradi odvzema izparilne toplote. Ta stopnja koncentracije raztopin pred zamrznitvijo navadno ni škodljiva za produkt. Da se tekočina ne bi penila in da bi dobila čim večjo površino, navadno izvajajo med zamrzovanjem zmerno centrifugiranje. V bučki, ki se vrti okrog svoje osi, se tekočina dvigne v tanko plast ob steni, kar je ugodno tudi za kasnejše sušenje. V skupini ampul, zataknenih v nosilni okvir, se tekočina dvigne na zunanjo stran v obliki klina, ki ima tudi večjo površino, centrifugalna sila pa zaduši mehurje in pene.

b) Zamrzovanje v kopeli

Zamrzovanje v kopeli ima to prednost, da je lahko dokaj hitro tudi za večje količine snovi. Za kopel je najprimernejši alkohol (včasih je primeren tudi aceton, kjer se zaradi majhne viskoznosti temperatura dobro izenačuje). Kopel se ohlaja s hladilnim agregatom, vanjo je potopljena kača njegovega izparilnika.

V kopeli zamrzujejo tekočine (npr. krvno plazmo) v večjih bučah oz. posebnih steklenicah. Med počasnim vrtenjem se drži steklenica zelo poševno, da zaradi težnosti tekočina obliva steno in na njej postopoma zamrzne v obliki lupine. Kadar je vrtenje hitro, pa je os steklenice navpična, tekočina se dvigne ob steni zaradi centrifugalne sile in zmrzne.

c) Zamrzovanje na ploščah

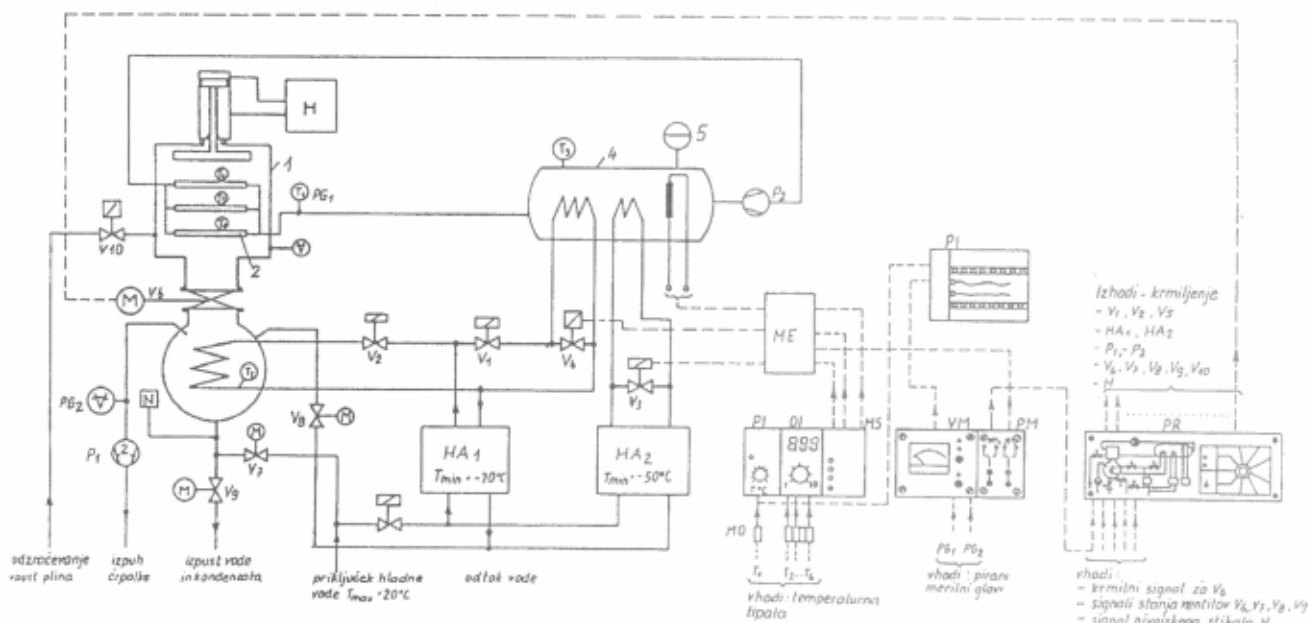
Zamrzovanje na ploščah, na katere postavljamo produkt, navadno v stekleničkah, je najbolj razširjeno in v industrijskih napravah za farmacijo praktično edino uporabno. Plošče so praviloma hlajene s hladilno napravo in so lahko nameščene kar v sušilni komori. V tem primeru zamrznjenega produkta ni treba prenašati iz ene naprave v drugo. Na dobro hlajenih ploščah na temperaturo -50°C in pri debelini plasti produkta okrog 10 mm je mogoče doseči hitrosti ohlajanja največ 4°C/min. Pri liofilizaciji raztopin brez živih celic je zaželeno, da so kristalčki ledu (in kasneje pore) dovolj veliki in med seboj povezani, sicer so težave pri sušenju. Srednji premer kristalčkov takoj po zamrznitvi je v tesni zvezi s hitrostjo ohlajanja: medtem ko je npr. pri 3°C/min okrog 4 μm, je pri 30°C/min le še 1 μm.

Splošna težnja je, naj se občutljive biološke snovi, kot so npr. beljakovine, čim manj časa zadržujejo v fazi zamrzovanja, ko koncentracija elektrolitov v preostali tekočini narašča in povzroča denaturacijo velemolekul. Zato je zaželena čim hitrejša zamrznitev, kristalizacija pa se lahko dokonča ali preuredi že v zamrznjenem stanju. Pri hitri zamrznitvi ali v omejenih majhnih področjih materiala s celičasto strukturo se lahko podhlajena tekočina strdi v steklast led, ki je zelo neugoden za liofilizacijo, ker ne pušča por. Zato ga skušamo naknadno kristalizirati s termično obdelavo.

Zelo hitra in zelo globoka zamrznitev, s čim manjšimi kristali ali brez njih, je potrebna za mikroskopske preiskave tkiv in celic. V ta namen je navadno potreben tekoči dušik.

Tudi raztopine z živimi celicami, bakterijami in virusi je navadno treba hitro zamrzniti, da se celice ne mudijo

¹ Mag. Bojan Povh je upokojeni sodelavec Inštituta za elektroniko in vakuumsko tehniko iz Ljubljane, ki je pred leti v okviru raziskovalne naloge obdelal to področje. Besedilo je za objavo priredil glavni urednik Vakuumista.



Slika 1: Shema naprave za liofilizacijo (1 - vakuumna komora, 2 - hladilna polica, 3 - kondenzator ledu, 4 - toplotni izmenjevalnik, 5 - ekspanzijska posoda, P₁ - vakuumna dvostopenjska črpalčka, P₂ - črpalčka za silikonsko olje, HA₁, HA₂ - hladilni agregat, H - hidravlična stiskalnica)

dolgo v koncentriranih raztopinah. Če do kristalov znotraj celic sploh pride, morajo biti zelo majhni, da ne poškodujejo celične strukture.

Za zamrznitev 1 kg na 0°C ohlajenega produkta (vodne raztopine) je treba odvesti okrog 420 kJ toplote. S tem upoštevamo tudi ohlajanje pod 0°C (toplotna kapaciteta ledu je pol manjša kot za tekočo vodo). Upoštevati moramo, da začnemo ohlajanje s sobne temperature, zato je poraba energije nekoliko večja. Vendar pa produkt, ki ga zamrzujemo, ni samo voda, ki ima razmeroma veliko specifično toplotno kapaciteto in tališno toploto. Če naj proces zamrzovanja traja od 1 do 2 uri, je torej za vsak kg polnjenja potrebna hladilna moč od 60 do 120 W. Pri tem nismo upoštevali toplotnih izgub, ki jih ocenjujemo med 50 in 100 W na vsak kvadratni meter površine zunanjih sten komore.

Pri temperaturi polic -50°C in debelini produkta do 2 cm je toplotno prevajanje dovolj hitro, da je čas zamrzovanja odvisen le od hladilne moči stroja. Za 4 kg produkta bi ta moral odvezemati kakih 500 W (pri -50°C).

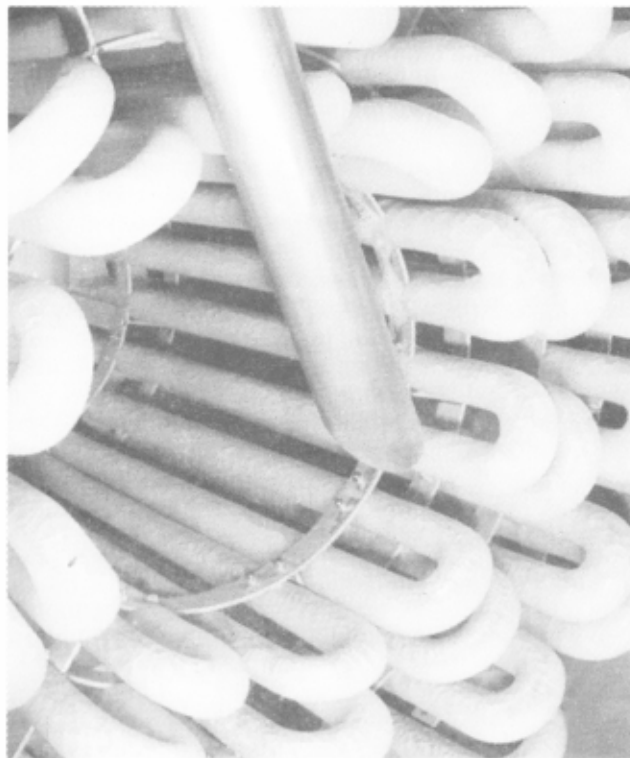
1.2 Sušenje s sublimacijo ledu

Odvija se vedno pri parcialnih tlakih vodne pare pod trojno točko, praktično vedno pod 1 mbar, v splošnem od 0,5 do 0,005 mbar; če je potrebna globoka zamrznitev za ohranitev vseh detajlov v tkivih, lahko v ekstremnih primerih tudi pod 10⁻⁵mbar. Pri nižjih tlakih in njim pripadajočih temperaturah dosegamo boljše kvaliteto, vendar na račun večjih stroškov, zlasti zaradi daljšega trajanja procesa. Poiskati je treba optimum, odvisen od produkta. Odčrpavati pa je treba tudi zrak iz dveh razlogov: da ne ovira transporta pare in da ni kisika, ki navadno škoduje osušenim produktom. Produktu je treba med procesom kontrolirano dovajati

toploto, da nadomeščamo izparilno toploto, ki jo odnaša para.

a) Odstranjevanje pare, kondenzator

Le pri zelo majhnih količinah produkta bi lahko shajali kar z mehansko črpalčko ali še z adsorpcijsko pastjo za paro. Vsi profesionalni liofilizatorji imajo vgrajene kondenzatorje s strojnim hlajenjem (slika 2).



Slika 2: 200 kg kondenzator ledu podjetja Finn-Aqua

Temperatura kondenzacijske površine naj bi bila okrog 20°C nižja od tiste, pri kateri sublimira produkt, da se ustvari zadosten padec tlaka za transport pare od cone sublimacije skozi porozno suho snov, eventualno še skozi filter in vrat steklenice ali ampule in skozi vakuumski vod. Za kondenzacijsko površino velja, kot smo izvedeli, grobo pravilo, naj bo 2-krat večja od površine polic za produkt. Tako plast ledu ne bo nikoli debelejša od 10 mm, kar je nekako meja za zadostno odvajanje toplote skozi led.

Za odtajanje nabranega ledu imajo nekateri kondenzatorji vgrajen električni grelnik, v industriji pa pogosto odmrzujejo z vročo paro.

b) Količinske zahteve za kondenzator in črpalko

Kondenzator mora pobirati ogromen tok pare, ki ga mehanska črpalka zmerne velikosti ne zmore. Zato mora biti tudi vakuumski vod od sušilne komore do kondenzatorja primerno dimenzioniran, naprej od kondenzatorja do črpalke pa je lahko veliko ožji. Tako nastaja zastoj, ki daje pari čas, da večkrat zadene hladne površine kondenzatorja in se na njih kondenzira. Le nezaten delež pare gre naprej v črpalko. Na začetku sušenja je parni tok večji kot proti koncu. Za farmacevtske produkte računajo, da v prvi četrtini časa izpari pol šarže; iz živil, ki se včasih sušijo pri višjih tlakih od 1 mbar, lahko že v prvi uri izpari 1/4 do 1/3 mase. Če vzamemo polnjenje 4 kg ledu, lahko torej na začetku računamo s hitrostjo odparevanja do 1kg/h. Vsak kg da pri tlaku 0,1 mbar in 0°C kar 12600 m³ pare, torej mora biti učinkovita črpalka hitrost kondenzatorja 3500 l/s. Sam kondenzator sicer to zahtevo precej presega, saj ima več tisoč cm² kondenzacijske površine, vsak cm² pa ima lahko črpalno hitrost za paro od 5 do 10 l/s. Poskrbeti pa je treba tudi za dovolj širok dostop pare do kondenzatorja. Pri nizkih tlakih sušenja je bolje, da je kondenzacijska površina nameščena kar v sušilni komori, brez cevne povezave.

Za črpanje pare se praviloma uporabljajo kondenzatorji, ki jih hladijo z dvostopenjskimi kompresorskimi hladilnimi agregati na okrog -60°C ali nižje. Hladilne cevi v kondenzatorju so v vlogi izparilnika za freon; postavljene so horizontalno in naj imajo rebrasto površino, da se tudi debelejša plast ledu zadovoljivo ohlaja. Kondenzator je lahko nameščen kar v sušilni komori ob strani polic. Tako dosežemo veliko črpalno hitrost in zato krajši čas sušenja, vendar se rob polic preveč ohladi zaradi sevanja. Bolj priporočljive so dvokomorne naprave s kondenzatorjem v posebni komori. Le tako lahko uporabljamo barometrično metodo določanja temperature v zmrznjenem vzorcu in ugotavljamo tudi konec sušenja. Razen tega lahko odtajamo kondenzator med zamrzovanjem novega produkta.

Za reduciranje zračnega tlaka (na okrog desetino vrednosti, ki jo ima v komori para) je nujno potrebna mehanska črpalka. Njena kapaciteta se ravna po zahtevi, da je v 10 do 15 minutah sposobna izčrpati ves sistem od atmosfere do parnega tlaka, ker bi v daljšem času lahko prišlo do tajanja produkta. V poštev pridejo oljno tesnjenje dvostopenjske rotacijske črpalke, ki morajo imeti ventil za dodajanje zraka (»gas ballast«). Pri velikih napravah ali pri zahtevanem nižjem tlaku je potrebna pomoč dvorotorske črpalke (roots). Uporabljali so tudi večstopenjske parne ejetorje, ki lahko z zelo veliko črpalno hitrostjo nadomestijo tudi kondenzator, vendar

so energijsko neekonomični in porabijo veliko hladilne vode.

c) Potrebna hladilna moč za kondenzator

Kondenzator se hladi z direktnim vbrizgavanjem freona. Temperatura mora biti vsaj -50°C pri začetnem velikem parnem toku. Pa vzemimo, da imamo šaržo 4 kg in da na začetku izhaja parni tok 1kg/h. Za zamrznitev 1kg pare, za katero predpostavimo, da ima okrog 0°C, je treba odvesti sublimacijsko toploto, ki je vsota talilne (335 kJ) in izparilne toplote iz tekočega stanja (2243 kJ). Razen tega je treba nastali led še ohladiti do -50°C (105 kJ). To troje skupaj da hladilno moč 745 W. Če upoštevamo še izgube skozi izolirane stene kondenzatorja (okrog 0,5m²), kot smo to storili pri zamrzovalni komori, dobimo potrebno hladilno moč okrog 800 W pri -50°C. V kasnejši fazi sušenja parni tok precej upade, s tem pa tudi potrebna hladilna moč. Dani hladilni agregat bo lahko tedaj dosegel nižjo temperaturo kondenzacijske površine.

d) Sušilne komore

Najbolj preprosta sušilna komora so kar steklene buče ali ampule s produktom, ki jih po več naenkrat priključimo prek razcepne rogovile na sistem za črpanje. V tem primeru je sušilna komora kar vsaka steklenica zase. Steklenice (ali ampule) so izpostavljene sobnemu zraku in se od njega ogrevajo. Dodatnega ogrevanja ni in na hitrost sušenja ne moremo vplivati, do pregreteja pa tudi ne pride. Način je uporaben za manj zahtevne produkte, pri katerih se ni treba bati vsakega delnega taljenja evtetikov. Nekateri laboratorijske naprave imajo sušenje pod poveznikom iz akrilnega stekla. V tem primeru že vsebujejo plošče za produkt, ki se lahko kontrolirano električno ogrevajo, v boljšem primeru pa s tekočim grelnim in hladilnim medijem, katerega temperaturo uravnava poseben termostat (npr. v območju od -30 do +50°C). Omenimo še napravo s termoelektričnim hlajenjem in gretjem, ki je primerna za liofilizacijo manjših vzorcev bioloških tkiv. Posušene ampule je treba navadno zataliti z gorilnikom pod vakuumom ali v inertni atmosferi. V ta namen jim po potrebi naknadno zožijo vratove in jih priključijo na gumijaste nastavke sekundarnega sušilnika, da so potem dostopne za odtalitev. Stekleničke pod poveznikom pa lahko zapremo tako, da s primernim sistemom vanje vtisnemo zamaške.

Za farmacijo, zlasti za proizvodnjo, pridejo najbolj v poštev sušilne komore z votlimi ploščami, v notranjosti katerih kroži hladilni in ogrevalni medij. Nanje se postavljajo steklenice, skledice, ampule s produktom. Tu se odvije ves proces, vključno zamrzovanje. Temperaturo polic spreminjamo po programu, ki je primeren za dani produkt. Sistem mora biti skrbno konstruiran, kajti v farmacevtski industriji je lahko vrednost enega polnjenja večja od investicije v napravo. Zaradi zahtev po sterilnosti naj bodo komora in police iz nerjavnega jekla (iz posebnega razloga z dodatkom titana). Če se sterilizira s paro, mora komora zdržati ta nadtlak. Da se lahko steklenice zamašijo v komori s hidravliko, morajo biti tudi police dokaj močne, za lažje čiščenje pa morajo biti gladke.

Gretje je treba skrbno regulirati, da ostane produkt zmrznjen (temperaturo je treba držati npr. kakih 5°C pod točko taljenja). Po drugi strani je treba tlak pare vzdrževati na primerni višini, da je prenos toplote v produkt čim bolj ugoden. Le z natančno regulacijo

temperature plošč dosežemo neoporečno in hkrati čim hitrejše sušenje, torej primerno produktivnost. Ogrevanje se seveda mora prilagajati poteku sušenja, proti koncu mora biti veliko manjše kot na začetku.

Temperatura polic naj bo nastavljiva vsaj od -50 do $+80^{\circ}\text{C}$, razlike na ploščah pa naj ne presegajo $\pm 1^{\circ}\text{C}$. Plošče imajo včasih vgrajena ločena tokokroga za hlajenje in gretje, veliko bolje pa je, če teče po prekatih v nerjavečih ploščah en sam medij, ki ga hladijo zunaj v protitočnem menjalniku ali ogrevajo s pretočnim grelcem. Kot medij se je najbolj obneslo silikonsko olje nizke viskoznosti. Hitrost hlajenja prilagodimo produktu – od $0,2$ do $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

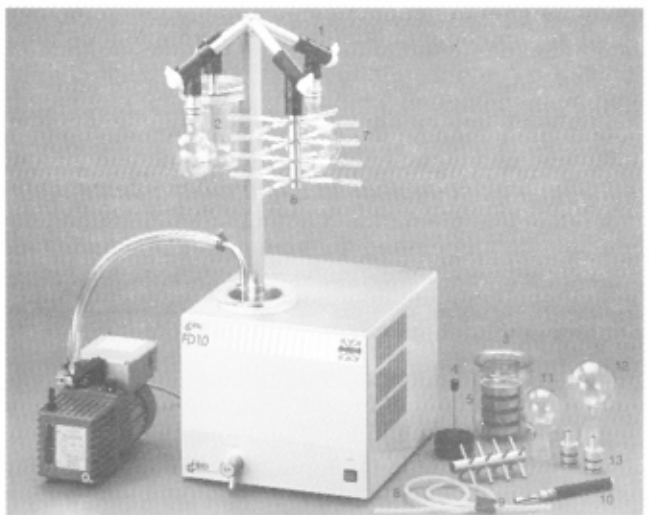
e) Zahteve pri sušenju

Produktu v komori je treba med sušenjem dovajati toploto, ki se porablja za sublimacijo. Ta toplota je enaka, kot smo jo izračunali pri kondenzatorju, le da jo je tam treba odvajati. Brez rezerve za izgube je za izparevanje $1\text{kg}/\text{h}$ (od ledu pri -40°C do pare pri 0°C) potrebna ogrevalna moč 740 W . Problem je, kako spraviti to toploto do sublimacijske cone v produktu, ne da bi ga prizadeli. Zamrznjen produkt namreč ne smemo nikjer segreti nad temperaturo začetnega taljenja. Eden od mehanizmov segrevanja je sevanje. Prevajanje toplote od plošč skozi plin je malenkostno pri tlakih pod $0,01\text{ mbar}$, pomembno pa postane pri tlaku okrog $0,5\text{ mbar}$. Če vzdržujemo tlak na primerni višji vrednosti, lahko čas glavnega sušenja skrajšamo za 30 do 50% . To lahko dosežemo na tri načine: s krmiljenjem priprtosti ventila proti kondenzatorju, s krmiljenjem temperature kondenzatorja, ali pa s kontroliranim vpuščanjem suhega zraka ali inertnega plina v komoro. Pri prvih dveh se parni tlak v komori poveča, še vedno pa ne doseže ravnovesnega za temperaturo sublimacije. S tem se nekoliko zmanjša Δp od sublimacijske fronte do površine produkta, in če bi ostalo pri tem, bi parni tok celo upadel. Pri konstantni temperaturi police pa se mora produkt segreti na višjo (še dopustno) temperaturo, in sicer sprva zaradi manjše porabe toplote za sublimacijo, dodatno pa zaradi večjega prevajanja toplote skozi paro pri višjem tlaku. S tem pa se izhajanje pare iz produkta poveča, tlak v komori se dodatno poveča in ko se doseže novo ravnotežje, je tudi iztok pare v kondenzator večji, kot je bil prvotno. Tlak v komori je pri tem še vedno pod ravnovesnim na fronti sublimacije, slednji pa mora ostati pod mejo, ki ustreza temperaturi začetnega taljenja.

1.3 Sekundarno sušenje

Ko led izgine in zato tlak znatno pade, moramo še več ur črpati za primerno desorpcijo vode iz produkta. Tlačna regulacija ne pride več v poštev, regulirati pa je treba temperaturo plošč (v splošnem od 30 do 60°C). Zelena vsebnost vlage se ravna po produktu in njegovi zahtevani dobi trajanja oz. uporabnosti. Za manjše zahteve zadošča kar črpanje prek kondenzatorja, če lahko dosežemo v njem vsaj -70°C . Ta je zdaj toplotno le malo obremenjen in lahko doseže svoj temperaturni ekstrem.

Za zelo suh produkt je potreben vakuum 10^{-3} mbar in trajanje črpanja 12 ur . Potrebna je že difuzijska črpalka, ker ima rotacijska premajhno črpalno hitrost. Za laboratorijske potrebe zadošča, da na sušilnik prigradimo



Slika 3: Laboratorijska izvedba liofilizatorja podjetja Kambič (zgoraj) in podjetja Heto (spodaj)

adsorpcijsko past, polnjeno s P_2O_5 (ki se zamenja) ali zeolitom (ki se da regenerirati pri 250°C ob prepihanju s suhim zrakom). Zlasti prva snov je zmožna posrkati paro do zelo nizkega tlaka (reda 10^{-5} mbar). Tako past je treba priključiti med dva zaporna ventila – proti komori in proti črpalki. Med uporabo je treba past in skoznjo tudi komoro izčrpavati z mehansko črpalko, da zrak ne ovira transporta pare. Kondenzator je treba pri tem ločiti od komore, sicer bi bil v teh razmerah le vir pare.

2 Preiskovalne in kontrolne metode

Za študij vedenja produktov pri zamrzovanju so razvili metodo t.i. termične analize. Njen princip je, da s termoelementom natančno sledimo poteku temperature v vzorcu pri enakomernem ohlajanju in ponovnem

enakomernem dovajanju toplote. Na krivulji temperature v odvisnosti od časa, ki jo registrirajo, se pojavijo rahle nepravilnosti (konice) pri vsaki endo- ali eksotermni spremembi v vzorcu. Zaradi boljše občutljivosti merijo diferencialno, ugotavljajo torej le razlike termonepetosti med študiranim in referenčnim vzorcem, postavljenim v identične razmere. Za ugotavljanje evtektičnega taljenja je bolj uporabna faza ponovnega ogrevanja. Za preučitev vpliva posameznih sestavin raztopine delajo diferencialne meritve z več primerjalnimi snovmi. S to metodo ugotavljajo tudi razne prekrystalizacije snovi, npr. transformacijo steklastega ledu. Tako je mogoče ugotoviti optimalne razmere za potek zamrzovanja, za t.i. termično obdelavo produkta. Lahko se izognemo številnim tipanjem in bolj ali manj neuspešnim poskusom liofilizacije. Za rutinsko uporabo pride bolj v poštev spremljanje električnih lastnosti produkta, zlasti upornosti. Možno pa je izkoristiti tudi dejstvo, da je dielektrična konstanta vode 81, ledu pa le 3 do 4 (v frekvenčnem področju, ki pride v poštev). Snov, pri kateri se spreminja temperatura, damo med plošči kondenzatorja in merimo kapacitivnost pri izbrani frekvenci.

Med metodami za ugotavljanje temperature evtektičnosti je merjenje električne upornosti ena najboljših. Ko tekočina zamrzuje, se ji upornost veča; zlasti strmo naraste, ko zmrznejo še zadnji kanali in s tem preneha prevajanje po ionih raztopine. Pri raztopini NaCl se to zgodi med -34 in -39°C , še nižje upornost le počasi narašča. Krivulje upornosti pri ohlajanju niso vedno ponovljive, motijo pojavi podhladitve ali npr. amorfnosti zamrznitev. Pri ogrevanju pa nastopi strm padec upornosti omenjene raztopine šele okrog -21°C , kar je ravno evtektična temperatura. Ta pojav je ponovljiv in je znak za začetno taljenje. Pri sestavljenih raztopinah sicer ni jasno definirane evtektične točke, vendar krivulja pri ponovnem ogrevanju preparata kaže področje, v katerem se strjena preostala koncentrirana raztopina (pogosto v amorfnem stanju) postopno tali, komponenta za komponento. Na krivulji se tudi opazi, kadar pride do rekristalizacije. Z zelo občutljivo napravo se tudi dokaže, da malo preostale tekočine navadno še ostane, strdi se šele pri zelo nizki temperaturi. Tako lahko dobimo z merjenjem upornosti važne informacije o vedenju preparata pri zamrzovanju in sušenju in imamo možnost spremljanja njegovega stanja med procesom. Električno dobljen podatek o stanju preparata se celo lahko uporabi za avtomatsko krmiljenje procesa.

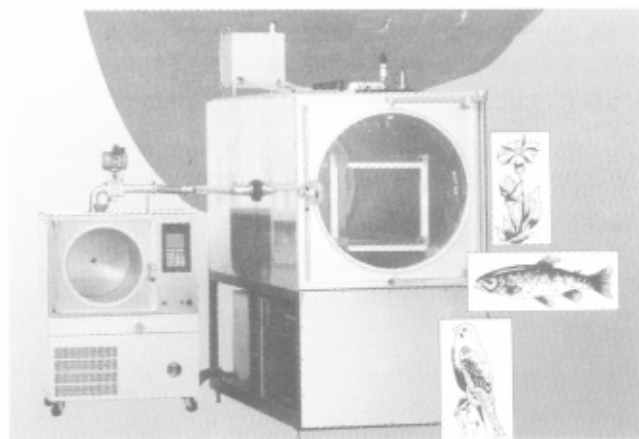
Na tej osnovi so razvili pri podjetju Leybold-Heraeus t.i. evtektični monitor, ki ga že dolgo prodajajo. Naprava ima merilno sondo z elektrodama (za izmenično napetost) in platinski uporovni termometer (električno izoliran), ki ju je treba vstaviti v vzorec. Za preiskovalne namene je treba imeti zraven še majhno zmrzovalno napravo za hlajenje in ogrevanje po določenem programu.

Merilno celico je mogoče vstaviti tudi v komoro liofilizatorja in spremljati produkt med procesom: sprva upornost zmeroma upada zaradi ogrevanja, po umikanju sublimacijske fronte pa narašča in je pri povsem suhem produktu zelo velika. Tako imamo lahko stalno kontrolo, da ne pride do taljenja. Možno je tudi, da s spremljanjem stanja v reprezentativnem vzorcu produkta krmilimo proces. Ogrevanje se tedaj avtomatsko

prilagaja, da vzdržuje upornost konstantno ali da sledi vnaprej izbrani krivulji.

Za študijske namene obstaja še drug monitor, opremljen z mikroskopom, s katerim direktno opazujejo formiranje kristalov v vzorcu. Ta se ohlaja v kontroliranih razmerah, ki jih omogoča oprema samega monitorja. Vzorec je v vakuumu, med objektiv in krovno steklo pa pihajo dušik, da ne pride do kondenzacije. Območje je od -100 do $+100^{\circ}\text{C}$, hitrost hlajenja ali gretja od 1 do $25^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Na razpolago je tudi kamera.

Če polnjenje liofilizatorja ni homogeno in ni mogoče najti reprezentativnega vzorca, je bolj primerna kontrola na osnovi merjenja ravnovesnega tlaka vodne pare. V ta namen je treba za kratek čas izolirati komoro od črpanja, da tlak naraste do nasičene vrednosti pri temperaturi površine sublimacije. Tako zelo hitro dobimo povprečno temperaturo sublimacije, pri čemer zajamemo ves produkt, zlasti najtoplejše zamrznjene dele.



Slika 4: Liofilizator za konzervatorske namene, ki so ga izdelali v podjetju Heto

To, t.i. barometrično metodo ugotavljanja temperature je patentiralo podjetje Leybold-Heraeus. Med sušenjem je zaradi črpanja parni tlak v komori vedno nižji od nasičenega. Če pa komoro ločimo od kondenzatorja s posebnim ventilom, ki se hitro zapira, se tlak že po nekaj sekundah približa ravnovesnemu. Ugotavljamo ga z vakuummetrom (na toplotno prevodnost) in je merilo za sublimacijsko temperaturo. Pri tem mora biti netesnost komore zanemarljiva. Meritev je mogoče v določenih presledkih avtomatično ponavljati, vmes pa se produkt praktično nemoteno suši. Kolikor je ugotovljena temperatura višja ali nižja od želene, se gretje avtomatsko popravi. To najbolj zanesljivo in natančno metodo spremljanja sušenja uporablja omenjeno podjetje pri večini svojih liofilizatorjev.

Ko je sublimacija pri kraju, se porast tlaka močno zmanjša. Tako nam da metoda merjenja porasta tlaka tudi signal, da je glavno sušenje končano. Pri sekundarnem sušenju seveda ne moremo na tej osnovi ugo-

tavljati temperature vzorca, pač pa lahko približno ugotovimo ravnotežni tlak pare nad osušenim preparatom. Za to je treba ločiti črpalko za nekaj minut. Če poznamo desorpcijsko izotermo vzorca, lahko s tem tudi približno določimo vsebnost preostale vlage.

Druga metoda za določanje vlage med samim sekundarnim sušenjem je merjenje rosišča, vendar je treba poznati izoterme za razne produkte. Nadaljnje metode zahtevajo poseg v proces in vzorec. Tako npr. lahko vzorec tehtamo prvič in še po dodatnem sušenju v eksikatorju s P_2O_5 ali molekularnim sitom, morda pri zvišani temperaturi.

Objektivna metoda za določanje vsebnosti vode je Karl-Fischerjeva. Temelji na reakciji joda in SO_2 , ki sta raztopljena v brezvodnem mediju iz piridina in metanola. Če pride zraven nekaj vode, jod oksidira SO_2 v SO_3 , sam pa se reducira v brezbarven jodovodik HJ.

Piridin ima nalogo, da prej raztoplja SO_2 , nato pa kemično veže nastajajočo kislino HJ in tako omogoča napredovanje reakcije. Metanol je topilo za jod, kasneje pa tvori ester žveplene kisline. Če pri preiskavi postopno dodajamo vzorec (ob stalnem mešanju), preide rjava barva joda pri končani titraciji v rumeno. Razvita je tudi električna metoda ugotavljanja titracijske točke, ki je bolj natančna, kot je opazovanje barve.

3 Sterilizacija naprav za liofilizacijo /7/

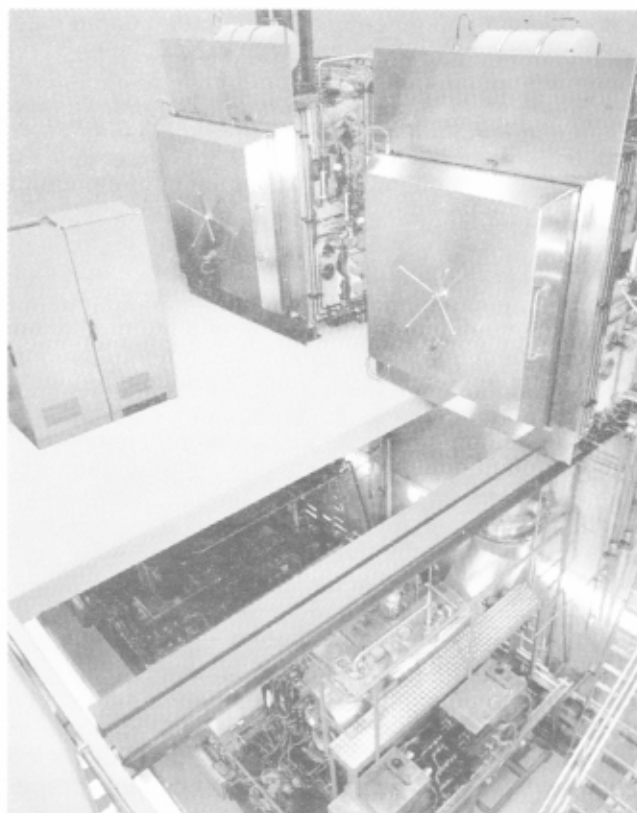
Po daljši uporabi pride v poštev umivanje naprave z antiseptičnimi sredstvi. Zato mora konstrukcija omogočati dostop do vseh notranjih delov komore. Bolj pogosto pa je potrebna hitra in preprosta sterilizacija naprave s kondenzatorjem in povezovalnim vodom vred. To se pri industrijskih napravah navadno izvaja z nasičeno paro pri temperaturi okrog $126^{\circ}C$, ki ji ustreza tlak 2,5 bar. Dokler je kondenzator še hladen, je treba izčrpati sistem do okrog 0,5 mbar. Nato vpustimo paro v komoro (s posebej zavarovanimi vrati) in kondenzator, ki ga na ta način hkrati odtajamo. Kondenzat odteka skozi nepovratni ventil, ki se odpre šele, ko nastane v sistemu nadtlak. Za tem je treba sistem osušiti s črpanjem npr. s črpalko na vodni obroč. Končno je treba pred vložitvijo novega produkta komoro ohladiti, zato morajo biti njene stene in vrata v tem primeru opremljene s hladilnimi kačami.

Manjši liofilizatorji pa niso grajeni za nadtlakno paro, zato je treba uporabiti drugačen način sterilizacije. Metoda mora v velikem deležu uničiti tudi spore mikrobov, ki so najbolj odporne. Suha vročina ni posebno učinkovita: pri $150^{\circ}C$ je treba vse(!) dele držati vsaj 2 uri, kar ni preprosto. Najbolj primerna je t.i. plinska sterilizacija, ki sicer tudi zahteva določeno vlago, vendar znatno nižje temperature in ne nadtlaka. Cenena metoda je še obsevanje z UV svetlobo (254 nm) iz nizkotlačnih Hg-razelektrivnih cevi /8/, vendar pride v poštev bolj za delovni prostor kot za notranjost naprav. Doza 5 mJ/cm^2 je navadno zadostna, da se 90% bakterij ne more več razmnoževati.

Pri plinski sterilizaciji se uporabljajo kemikalije v obliki plinov in par. Večinoma so toksične, včasih vnetljive, utegnejo povzročati korozijo. Naštejmo jih po vrstnem redu po pogostosti in splošni uporabi, npr. v bolnišnicah, za sterilizacijo hrane ipd.: etilenoksid, propilenoksid, formaldehid, metilbromid, beta-propiolakton.

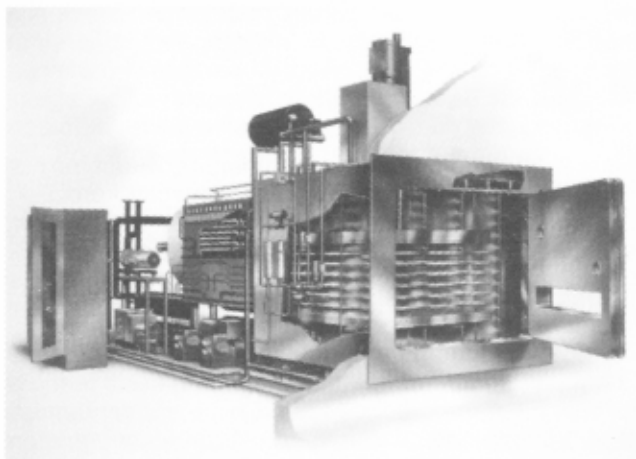
Etilenoksid (C_2H_4O) ima vrelišče $10^{\circ}C$, v zraku se vname v širokih mejah od 3,6 do 60 vol.% in zato zahteva razredčenje npr. s CO_2 . Je dokaj strupen – največja koncentracija v zraku (za dihanje) je 50 ppm. Za sterilizacijo uporabljajo koncentracije od 400 do 1000 mg/l, vendar je potrebna še prisotnost vodne pare, in to relativna vlažnost med 25 do 50%. Pri koncentraciji 40 vol.% v vlažni atmosferi je po nekih podatkih potreben čas za sterilizacijo pri $65^{\circ}C$ dobrih 20 min, pri $98^{\circ}C$ pa že pod 1 min. Nato se plin zlahka odstrani s pretokom pare ali evakuiranjem. Ne razjeda kovin, ne kvari tesnil.

Propilenoksid (C_3H_6O): vrelišče $34^{\circ}C$, vnetljivost med 2,1 in 21,5 vol.%. Za varno uporabo ni vedno nujno razredčenje. Za sterilizacijo se vzame 800 do 2000 mg/l, potrebna vlažnost je med 25 in 50%. Je manj toksičen (dopustna koncentracija 150 ppm), a tudi manj baktericiden; tudi ne povzroča korozije.



Slika 5: Industrijska naprava za liofilizacijo LYOVAC GT 500-D podjetja AMSCO Finn-Aqua

Formaldehid (CH_2O): vrelišče $-21^{\circ}C$, toda v obliki formalina (38% vodna raztopina) pri $90^{\circ}C$. Meje vnetljivosti v zraku: 7 do 73 vol.%, toda nevarnost se zmanjša z velikim procentom vode, ki je navadno prisotna. Za sterilizacijo se navadno vzame le 3 do 10 mg na liter volumna, potrebna pa je visoka vlažnost (čez 75%). Je močno baktericiden, učinkovitost narašča s temperaturo. Je zelo toksičen (največ 5 ppm), vendar ga je po vonju lahko odkriti. Napada medenino, nad $40^{\circ}C$ tudi Al in jeklo, medtem ko sta Cu in nerjaveče jeklo odporna. Rahlo napada tesnilne gume, razen silikonskega kavčuka in vitona. Toda v prisotnosti vlage nastaja iz njega mravljična kislina, ki nekoliko napada tudi nerjavno jeklo (ne pa Cu in viton).



Slika 6: Shema industrijske naprave za liofilizacijo podjetja BOC Edwards Calumatic

Metilbromid (CH_3Br) ima vrelišče pri $4,6^\circ\text{C}$ in praktično ni vnetljiv. Ni učinkovit sterilizant, potrebno je okrog 3500 mg/l in zmerna vlažnost.

Beta-propiolaktan ($\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2$): kot brezbarvna tekočina vre pri 163°C in ni nevarnosti, da bi se vnel pri sobni temperaturi. Za sterilizacijo je treba 2 do 5 mg/l in vlažnost nad 75% . Je zelo močno baktericiden; za popolno uničenje spor je potrebno okrog 40 min pri 27°C in 5 min pri 50°C ob zadostni relativni vlažnosti. Je malo toksičen pa še jedek vonj ima. Tekoč napada medenino, Cu in navadne tesnilne gume; varni so Al, nerjavno jeklo in plastične snovi.

Iz tega pregleda je že jasno, da je za naš namen najprimernejši beta-propiolaktan. Priporočljivo je najprej segreti stene komore z vročim zrakom ali še bolje z nizkotlačno paro, dokler ne dosežemo potrebne temperature in vlažnosti. Nato dodamo določeno količino BPL iz paritvijo ali razpršitvijo. Po nekih meritvah je BPL okrog 25-krat bolj baktericiden kot formaldehid, 4000-krat bolj kot etilenoksid in 50000-krat bolj kot metilbromid. Ni pa za naprave z vgrajenimi Cu-kačami in neoprenskimi tesnilji. Vse naj bo iz nerjavnega jekla, tesnila pa iz vitona. Če imamo v kondenzatorju Cu-kačo, je treba odčrpavati sterilizant po obvodu in skozi past z aktivnim ogljem, ki je pred črpalko. Ni pa težav, če imamo kondenzatorjevo kačo iz nerjavnega jekla: po opravljeni sterilizaciji lahko BPL in vodno paro zamrznemo in kasneje kondenzator normalno odtalimo z vodo, da raztopljeni BPL odteče v kanal.

Etilenoksid za farmacijo ni zanimiv, ker zahteva komplicirane varnostne ukrepe. Bolj na široko se uporablja formaldehid, tudi za sterilizacijo liofilizatorjev. Paro do-

bivajo iz formalina v posodi z vodnim plaščem, ki ga električno ogrevajo z vgrajenim potopnim grelcem (na vsaj 40°C in 30 min v zaprti komori). Zraven je koristno imeti še higrometer. Pare potem pustijo učinkovati 12 ur pri sobni temperaturi. Največji problem pa je nastajanje mravljinčne kisline, ki bi kontaminirala olje v črpalki in povzročila v njej korozijo. Zato je pred črpalko obvezna past z aktivnim ogljem.

Seveda pa periodična sterilizacija naprave sama po sebi še ni dovolj, temveč je treba tudi preprečiti inficiranje produkta med polnjenjem in praznjenjem naprave. Tu poudarimo le pomen vgradnje filtra proti bakterijam na ventil, skozi katerega vpuščamo v komoro plin do atmosferskega tlaka. Tak filter iz impregniranih celuloznih vlaken lahko zadrži celo vse viruse. Periodično ga steriliziramo v avtoklavu.

4 Sklep

Medtem ko je lahko liofilizator za laboratorij zelo preprost, pa mora biti proces v proizvodnji avtomatsko krmiljen in biti reproducibilen. Vsi agregati morajo biti varovani pred možnimi motnjami in tudi napakami pri ravnanju. Že malo večje pilotne naprave zahtevajo regulacijo temperature plošč z ročnim vodenjem temperature ali s programatorjem, ki mu nastavimo podatke. Poleg tega je zaželen elektronska regulacija tlaka v komori, ki ga vzdržujemo na optimalni vrednosti (v odvisnosti od produkta), da dosežemo krajši čas sušenja. Važna je tudi registracija vseh pomembnih parametrov za proces.

V največji meri se da ves proces avtomatsko nadzirati in krmiliti z računalnikom. V spomin se vloži program za produkt ali se le vstavijo parametri, odvisni od produkta (temperature, tlaki, časi), in potem naprava popolnoma sama vodi liofilizacijo in jo sproti optimira na osnovi merjenih podatkov. Tudi metoda porasta tlaka se avtomatsko izvaja, pri čemer ima ugotovljeni tlak prednost pri regulaciji gretja plošč pred temperaturnim programom. Prav tako je mogoče avtomatizirati druge spremljevalne operacije (vpust zaščitnega plina, zapiranje steklenic, izklop naprav, odtajanje kondenzatorja, sterilizacija ipd).

5 Literatura

- /1/ J. Gasperič, Vakuumist, 19, 1, 1999, 30-31
- /2/ M. Heldner, Vakuum in Forsch. und Praxis, 4, 1997, 281-288
- /3/ J.M. Flink, H. Knudsen, An introduction to freeze drying, Heto LabEquipment A/S, Birkerød, 1983
- /4/ Brošura podjetja Leybold
- /5/ Brošura podjetja Edwards
- /6/ Brošura podjetja Heto
- /7/ E.W. Malpas, The sterilization of freeze drying equipment, Vacuum, 17, 1967, 639
- /8/ M. Pribošek, Vakuumist, 11, 2/3, 1991, 20-24