

## OSNOVE LIOFILIZACIJE (II. del)

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

### Basics of freeze drying (Part II)

#### ABSTRACT

In the second part of the article the three of the most important steps of the freeze drying, pre-freezing, primary drying by sublimation under vacuum and secondary drying by desorption are analysed. Various techniques of freezing and drying are also explained.

#### POVZETEK

V drugem delu prispevka analiziramo tri najpomembnejše korake pri liofilizaciji: zamrzovanje, primarno sušenje s sublimacijo in sekundarno sušenje z desorpcijo. Opisujemo tudi različne tehnike zamrzovanja in sušenja.

### 1 Zamrzovanje preparatov

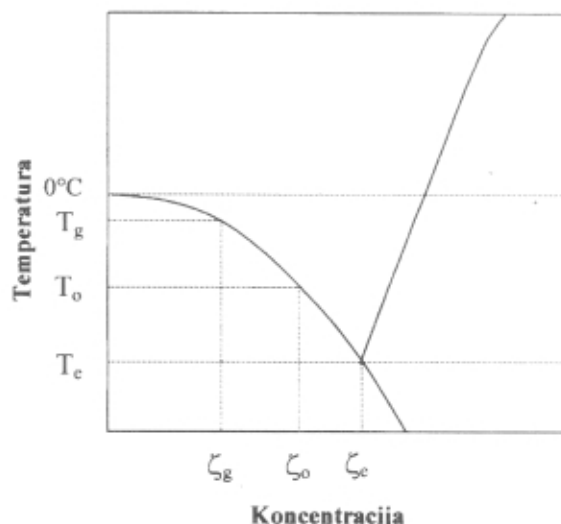
#### 1.1 Osnove in pomen

Pri liofilizaciji ima potek zamrzovanja odločilen pomen; od njega sta predvsem odvisna uspeh sušenja in kvaliteta produkta. Postopek mora biti prilagojen lastnostim snovi in geometriji hlajenja (tipu posode), pri čemer ni splošno veljavnega pravila. Izbiramo ga na podlagi podobnih izkušenj in optimiramo s poskusi. Predvsem gre za dve vprašanji, kako globoko in kako hitro je treba spreminjati temperaturo.

Čista voda začne zmrzovati že malo pod 0°C. Če so na razpolago primerna kristalizacijska jedra (lahko na sami površini posode, ali če je voda izpostavljena tresljam), pri počasnem zamrzovanju ne pride do bistvene podhladitve. Končno je že pri 0°C mogoče dobiti čisti led. Do večje podhladitve lahko pride zlasti, kadar je gibanje molekul omejeno, npr. v kapilarnih sistemih /1/.

Pri vodni raztopini pa se ledišče zniža, in to tem bolj, čim bolj je koncentrirana. To podaja levi krak krivulje na sliki 1, ki velja za binarno zmes (vode in npr. soli), katere ena komponenta ni topljiva v kristalih druge /2/. Pri ohlajanju se izločajo kristali čistega ledu, preostala raztopina pa postaja vse bolj koncentrirana. To gre do evtektične točke. Pri višjih koncentracijah je treba upoštevati topnost soli v vodi - desni krak krivulje na sliki 1. Kjer se oba sekata, je evtektična točka. Samo tu se lahko hkrati izločajo kristali obeh komponent, tako da dobimo (ob zadostni prisotnosti jeder in nadaljnjem odvajanju toplote) že pri tej temperaturi zelo fino zrnato trdno snov - evtektik. Za kuhinjsko sol je evtektična temperatura -21,3°C, za CaCl<sub>2</sub>, ki v bioloških snoveh tudi pogosto nastopa, pa -55°C. Navadno pride do večje ali manjše podhladitve, tako da je del snovi tekoč še pri nižjih temperaturah (pri kuhinjski soli lahko do -40°C). Pri ogrevanju pa nastopi prvo taljenje točno pri evtektični temperaturi. V splošnem je za veliko število bioloških produktov povsem varno, da jih zamrzujemo do -80°C in nato dvignemo temperaturo med sušenjem do -40°C /1/.

Ker je v bioloških snoveh navadno veliko topnih komponent, njihov vpliv na zamrzovanje pa je le delno znan, je le-to bolj komplicirano, a kljub temu govorimo o evtektični točki, boljše con, pod katero naj bi bila vsa voda zmrznjena. So pa problemi s podhladitvijo tekočih ostankov, koloidna mreža povzroča dodatno depresijo zmrzišča, nekateri ogljikovi hidrati ne kristalizirajo (škrob), v proteinih ostaja voda. Zato praviloma ohlajamo produkte znatno pod njihovo evtektično točko.



Slika 1: Talični diagram binarne vodne raztopine

V splošnem velja, da počasno zamrzovanje povzroča velike kristale ledu, ker se pri majhni podhladitvi formira le malo kristalnih klic in potem naraščajoči kristali ne ovirajo drug drugega. Težava pri ustvarjanju dovolj velikih klic je v tem, da zaradi sproščene talilne toplote pride do lokalnega segretja, tališče majhnih klic pa je že tako zvišano zaradi visokega tlaka, ki ga povzroči površinska napetost. Pri hitrem zamrzovanju je podhladitev večja in zato hitro zraste mnogo klic in je led po zmrznitvi drobnozrnat.

Veliki kristali so zaželeni npr. pri liofilizaciji tekočih neživih raztopin, da dobimo po osušitvi večje luknjice, ki med samim sušenjem dobro prevajajo paro, pri rehidraciji pa snov hitro sprejme vodo. Nasprotno je treba hitro zamrzniti žive celice, da veliki kristali ne raztrgajo celičnih membran in ne poškodujejo strukture. Primesi raztopljenih snovi, zlasti nekaterih organskih, zelo vplivajo na hitrost kristalizacije in na obliko kristalov.

Ostanki koncentrirane raztopine lahko pri hitri in globoki ohladitvi zamrznejo v amorfnosteklasto snov, ki je močna ovira za sušenje. Tudi kristali so lahko pri hitri zamrznitvi preveč neenakomerni. Zato je treba včasih z dodatnim segrevanjem do evtektične temperature (t.i. termična obdelava) doseči prekristalizacijo produkta. Za histološke preiskave je steklasta zamrznitev zaželena, da kristalizacija ne bi spremenila strukture /3/. Zato je treba celice ekstremno hitro zamrzniti, npr. s potopitvijo v izopentan ali propan, ohlajen s tekočim

<sup>1</sup> 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. Tekst je za objavo priredil glavni urednik Vakuumista.

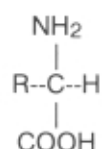
dušikom. Končno strukturo zamrznjenega produkta torej določa ne le dosežena temperatura, temveč zgodovina ohlajanja. Najprimernejši postopek za dani produkt ugotavljajo s poprejšnjimi preiskavami, o teh pa kasneje. Končni dokaz, da je zamrznitev primerna, pa je šele uspešno sušenje.

## 1.2 Škodljivi vplivi

Občutljivim snovem utegne škoditi povečanje koncentracije raztopljenih snovi (zlasti elektrolitov), do katerega pride v še ne zamrznjeni tekočini. S tega stališča je zaželeno, da je učinek koncentriranih elektrolitov čim krajši, da torej hitro preidemo določen temperaturni interval, v katerem še nastopajo ostanki tekoče faze /1/. Lipoproteidi so npr. stabilni v razredčenih raztopinah soli, kislin idr., v koncentriranih pa se neobrnljivo spreminjajo. To so važni gradniki celic, zlasti membran. Najdemo jih v steni eritrocitov, jajčnem rumenjaku in drugje. Dolgo niso mogli uspešno liofilizirati eritrocitov; da se pa mešanica rumenjaka in beljaka, torej prvi verjetno ščiti drugega. Druge varovalne snovi pri zamrzovanju živih celic so saharoza, glukoza, laktoza, fruktoza, dekstrin, želatina, glicerol, etilenglikol, dimetil-sulfoksid, metilformamid; za bakterije pa posneto mleko, gojiščna juha ipd. Dodatki lahko tudi zmanjšajo hitrost napredovanja kristalinične fronte in zagotavljajo neko vrsto zaščite proti osmotskemu šoku.

Zmrzovanje znotraj celic je največkrat usodno, a do njega pride težje zaradi večje koncentracije makromolekularnih snovi, zakasnelega tvorjenja ali izostanka kristalnih klic (zaradi majhnosti področja). Bakterije najlaže preživijo, če uporabimo zaščitne raztopine, katerih osmotski učinek povzroči delno odstranitev vode iz celic, tako da nastopi njena kristalizacija in posledični porast koncentracije soli le zunaj celic /3/. Ko koncentracija zunaj raste, se osmotski učinek še poveča in z njim odhajanje vode iz celic. Varovalne snovi so pogosto polarne in imajo najbrž lastnost, da se vežejo na proteine na mestih, od koder je bila voda med zamrzovanjem odtegnjena in ki bi se sicer neobrnljivo spremenila.

Pri liofilizaciji želimo ohraniti karakteristične lastnosti, ki so odvisne od strukture in prostorske orientacije (t.i. konformacije) beljakovinske molekule. V osnovi so beljakovine sestavljene iz okrog 20 različnih gradnikov - aminokislin, ki imajo strukturo:



in se razlikujejo po ostanku R. Ti gradniki se povežejo v dolge peptidne verige (CO enega z NH naslednjega, pri čemer nastane molekula vode). Poleg te stabilne kovalentne vezi se posamezne aminokislinske povezujejo še s šibkimi vodikovimi vezmi (s posredovanjem vode, ki se veže na polarne ostanke), kar daje verigam sekundarno strukturo (prostorsko konfiguracijo). Poznamo tri osnovne konfiguracije:  $\alpha$  (vijačnica, kot v volni),  $\beta$  (zganjen list, kot v svili) in trojno vijačnico (kolageni v koži). Nadalje nastopa terciarna struktura, ko najdemo omenjene strukturne elemente le v od-

sekih verige, vmes pa so manj urejene sekvence aminokislin; tako nastanejo klopčičaste tvorbe, fiksirane z žveplovimi mostovi (kovalentna vez med atomoma žvepla na različnih R) ali z drugačnim sodelovanjem med ostanki R (poleg polarnih imamo še hidrofilne, pretežno na površini proteina, in hidrofobne, pretežno v notranjosti; tudi pri slednjih voda ni brez vloge, saj inducira interakcije med hidrofobnimi atomskimi skupinami proteina). Obstaja še kvartarna struktura, ko se veže več proteinskih molekul v kompleks.

Le primarna struktura in žveplovi mostovi so kolikor toliko stabilni, sicer pa je konformacija proteina labilna, zelo odvisna od vode v njem. Nanjo vplivajo lastnosti raztopine-okolja, kot so temperatura, vsebnost soli, pH in drugo. Majhne spremembe povzročajo večinoma reverzibilne spremembe konformacije, velike pa denaturacijo. Obsežnost sprememb je v našem primeru odvisna od načina zamrzovanja, narave in koncentracije sestavin v raztopini (soli, sladkorji), koncentracije samih proteinov, hitrosti hlajenja, najnižje dosežene temperature in njenega trajanja, seveda pa tudi od načina eventualnega odtajanja.

Razen proste vode v raztopini najdemo torej v bioloških snoveh tudi tako, ki je bolj ali manj vezana na makromolekularne komplekse in s katere odvzemom tvegamo, da povzročimo ireverzibilne spremembe. Del vode je tudi nepogrešljiva sestavina same koloidne strukture. Proteine je treba liofilizirati vedno v vodnih raztopinah, prisotnost organskih topil je skrajno nezaželena. Tudi soli niso zaželene in jih odstranjujemo iz proteinskih raztopin, če jih npr. dializiramo proti vodi. Vendar je pri mnogih proteinih neka vsebnost soli neizogibna za stabilnost (med  $10^{-3}$  in  $10^{-2}$  M). Glede pH ima večina proteinov optimalno stabilnost pri vrednosti 7 (nevtralnopolje). Čim hitreje zamrzujemo, tem manj se utegne pH med postopkom premakniti; če vemo, kako se premakne, lahko začnemo z ustrezno višjim ali nižjim pH (do premika pride, kadar uspejo določene sestavine raztopine prej kristalizirati kot druge).

Literatura navaja primere neobrnljivih modifikacij proteinov zaradi dehidracije: pri asparaginazi se spremeni razmerje med  $\alpha$  in  $\beta$ , katalaza pretrpi disociacijo na podenote, ki jo spremlja pomembno zmanjšanje encimatske aktivnosti. Pri dehidrogenazi, katere strukturne spremembe so študirali s paramagnetno spinsko resonanco, pade aktivnost, ne da bi bilo to vedno povezano z občutnimi strukturnimi spremembami. Visoka koncentracija NaCl npr. pospeši razpad encima na podenote in ponovno združevanje v hibride, medtem ko dodatek glicerola to ovira, že z blaženjem koncentracije.

Po drugi strani so močno dehidrirani proteini (po sušenju) bolj občutljivi za druge faktorje denaturacije, npr. za oksidacijo.

## 1.3 Izračunavanje in postopki

Za računanje ohlajanja potrebujemo specifično toploto produkta. Za vodo (pri  $15^\circ\text{C}$ ) je  $c_v$  4185 J/kgK; v primerjavi s to vrednostjo, ki je bila včasih enota, je  $c_t$  za ogljikove hidrate 0,34-, proteine 0,37-, maščobe 0,4-, za soli pa 0,2-krat tolikšen. Za zmes vode (z masnim deležem  $\xi_v$ ) in trdne sestavine velja približno:

$$c = \xi_v c_v + (1 - \xi_v) c_t$$

To velja za ohlajanje do 0°C, nižje pa moramo upoštevati še delež ledu, katerega  $c_l$  je približno 0,5-krat tolikšen kot za vodo.

Za toplotno prevodnost  $\lambda$  je težje, zlasti med zmrzovanjem. Za tekočo vodo je  $\lambda$  okrog 0,58 W/mK, približno enako tudi za mleko ali krvno plazmo, za kri (pri 37°C) je 0,51, za organske kemikalije večinoma med 0,1 in 0,2, za mlečno maščobo 0,17 W/mK. Za led pri 0°C je 2,2 W/mK (pri -50°C pa že 2,8).

Največ toplote odda snov pri samem zmrzovanju, in to tudi najdlje traja. Če vzamemo, da je voda že ohlajena na 0°C, lahko trajanje zmrzovanja plasti z debelino  $d$  razmeroma preprosto ocenimo /2/. Talična toplota vode  $\Delta_i$  je 334 kJ/kg, a vzamemo nekaj več, recimo 420 kJ/kg, da približno zajamemo še ohlajanje pod 0°C. Plast hladimo z ene strani s kontaktnim hlajenjem,  $\alpha$  naj bo koeficient prenosa toplote od površine ledu pri temperaturi  $T'$  na trdno podlago pri  $T_1$ . Ob nekem času  $t$  je fronta zmrzovanja, ki ima temperaturo  $T_0$  (pri vodi 0°C), na razdalji  $x$  od hladilne površine. Ko se  $x$  večja, se na enoto ploščine in enoto časa sprošča toplota:

$$\dot{Q} = \rho \Delta_i dx/dt \quad (1)$$

Ta odteka skozi plast ledu s prevodnostjo  $\lambda$ :

$$\dot{Q} = (T_0 - T')\lambda/x$$

in jo nato sprejema hladilna podlaga:

$$\dot{Q} = \alpha(T' - T_1)$$

Iz zadnjih dveh enačb eliminiramo  $T'$  in izrazimo  $Q$  z razliko  $(T_0 - T_1)$ , nato vstavimo ta  $Q$  v (1) in dobimo:

$$\frac{dt}{dx} = \frac{\rho \Delta_i}{T_0 - T_1} \left( \frac{1}{\alpha} + \frac{x}{\lambda} \right) \quad (2)$$

Elementarna integracija (2) od  $x=0$  do  $d$  da trajanje zmrzovanja:

$$t = \frac{\rho \Delta_i}{T_0 - T_1} \left( \frac{1}{\alpha} + \frac{d}{2\lambda} \right) d \quad (3)$$

Koeficient  $\alpha$  je seveda odvisen od kvalitete toplotnega stika med ledom in podlago, značilna vrednost je npr. 1160 W/m<sup>2</sup>K. Za plast vode  $d=3$  cm,  $T_1=30^\circ\text{C}$  in  $T_0=0^\circ\text{C}$  dobimo čas zmrzovanja 3200 s. Pri zmrzovanju produkta s tokom hladnega zraka, ki je bolj v navadi pri obdelavi živil, je  $\alpha$  odvisna od hitrosti zraka in je precej nižja (pri 5m/s je  $\alpha$  le 27 W/m<sup>2</sup>K), zato je čas občutno daljši.

Obravnavajmo dejanskega poteka ohlajanja pred zmrzovanjem in med njim je bolj komplicirana. Baje /2/ je bilo to v šestdesetih letih rešeno za plošče, valje in kroglice. V teoretični knjigi s področja prevajanja toplote v trdnih telesih /4/ smo sicer našli precej rešenih nestacionarnih problemov prevajanja toplote v trdnini, tako za ploščo kot tudi za kroglo in valj. Problem pa je hujši, če gre hkrati za spremembo agregatnega stanja in je treba upoštevati, da se mejna površina med fazama premika. Mimogrede, o tem je prvi pisal J. Stefan (študij debeline polarnega ledu). Najpomembnejša eksaktna

rešitev je Neumannova: za zmrzovanje polneskončne področja  $x>0$ , ki je sprva na neki konstantni temperaturi nad tališčem, od  $t=0$  naprej pa se ravnina pri  $x=0$  vzdržuje na predpisani nižji temperaturi. V omenjeni knjigi pa je izrecno navedeno, da še ni eksaktne rešitve takega problema za ploščo končne debeline; še slabše je pri problemih radialnega toplotnega toka v cilindričnih ali sferičnih koordinatah; toda naloge se lotevajo z numeričnimi metodami.

Navedimo še nekaj praktičnih podatkov iz lit. /5/ za zmrzovanje fiziološke raztopine (NaCl):

1. Posode  $\phi=22$ mm, napolnjene do višine 10mm, postavimo na plošče, ohlajene na -50°C: povprečna hitrost ohlajanja (v področju od 0 do -40°C) je 0,03 K/s. Če pa ploščo hladimo na -100°C, je ta hitrost nekajkrat večja.
2. Enake posode potopimo v alkoholno kopel pri -50°C: hitrost je zdaj 0,17 K/s.
3. Enake posode potopimo v tekoči dušik: hitrost ohlajanja je že 3 do 4 K/s.
4. Podobne posode hitro vrtimo v alkoholni kopeli pri -100°C, da se raztopina dvigne ob steni v 0,5 mm debelo plast: hitrost je 20 K/s. Tak postopek se uporablja za večje količine krvne plazme, a tam je zaradi večje debeline hitrost manjša.
5. Če zamrzujemo majhne vzorce (1 mm<sup>3</sup>) za elektronsko mikroskopiranje s potapljanjem v kopel pri -210°C (tekoči dušik z odčrpavanjem plina), dosežemo 150 K/s.

Kar zadeva postopke zmrzovanja, je izbira metode odvisna od produkta in zahtevane hitrosti. Najbolj preprost postopek je kar zmrzovanje s hitrim evakuiranjem, pri čemer se produkt v tanki plasti (npr. omočeni listi zelenjave) ohladi zaradi porabe izparilne toplote. Preden pa ves zamrzne, lahko pride med sušenjem iz tekočega stanja do okvar dela materiala. Zato se to za zahtevnejše produkte ne uporablja. Predvsem v živilski industriji je v navadi zmrzovanje v hladilnikih z ventilacijo, zamrznjene produkte pa lahko pred sušenjem začasno shranijo v drugih hladilnikih. Najbolj razširjene so zamrzovalne omare in tuneli s prisilno konvekcijo hlajenega zraka. Tuneli za hlajenje majhnih kosov so lahko tudi prirejeni za kontinuiran pretok materiala. Posebno preprosta je izvedba naprav za kontinuirano hlajenje tekočin in pastastih produktov: tekočina se oprijema vrtečega se, hlajenega valja, na drugi strani pa se zamrznjena plast strga z valja. Obstajajo tudi naprave s tekočim trakom (iz nerjavnega jekla), ki se od spodaj ohlaja, nanj pa se stalno nanaša gosto tekoč produkt /2/.

Pogosto se uporablja ohlajanje s prevajanjem na hlajene plošče, ki je primerno bolj za medicinsko-farmaceutsko področje. Za mehke kosovni material ali tekočine v vrečkah je včasih ugodno, da se dajo plošče stisniti s hidravliko. Tako pride do boljšega toplotnega kontakta in čas ohlajanja se skrajša. V farmacevtski industriji se splošno rabita dve metodi zmrzovanja: statična s kontaktom s hladilno površino in dinamična ali rotacijska z vrtenjem steklenic v kopeli /3/. Skoraj vedno je dovolj, da produkt doseže -50°C, pri mnogih ni potrebno iti tako globoko. Pri statični metodi postavljamo stekleničke, skledice, pladnje na hlajene

plošče ali pa potapljamo stekleničke ali ampule v hladilne kopeli. Te pripravimo s hladilnim termostatom ali pa npr. z mešanjem alkohola in suhega ledu (CO<sub>2</sub>) v različnih razmerjih. Hitrost zamrzovanja je treba prilagoditi produktu, navadno pa je v mejah 1-4 K/min.

Dinamična metoda je predvsem primerna za večjo količino tekočine v eni posodi. Produkt hitro zamrzne in tvori tanko plast na steni posode, ki se potem zaradi velike površine tudi hitro osuši. Zelo hitro zamrzovanje, zaželeno npr. pri proteinskih raztopinah, dosežemo s potopitvijo v hladilno kopele iz acetona (ta ima manjšo viskoznost in omogoča hitro izenačevanje temperature). Ampule, le delno napolnjene, držimo v kopeli postrani in jih vrtimo.

Najbolje je, da se zamrzovanje izvaja v sami napravi za sušenje, če je opremljena z globoko hlajenimi ploščami. Tako poenostavimo delo in lažje zagotovimo sterilnost. Celo rotacijsko zamrzovanje je možno izvajati v isti napravi kot sušenje, če je konstrukcija temu prilagojena.

## 2 Sušenje iz zamrznjenega stanja

### 2.1 Splošne osnove

Sušenje iz zamrznjenega stanja poteka pri temperaturah, pri katerih ledeni kristali sublimirajo, ne da bi se prej stalili. Ta proces je možen pod trojno točko vode (0,01°C in 6,1 mbar), vendar pa zaradi primesi v produktu delamo pri znatno nižjih temperaturah. Največja možna hitrost sublimacije je odvisna od ravnotežnega parnega tlaka pri vsakokratni temperaturi, ki ga razberemo s slike 3. Čim nižjo temperaturo izberemo, tem počasnejši (in dražji) bo proces. Za sušenje živil uporabljajo tlačno področje od 0,3 do 1 mbar (temu ustrezajo temperature približno med -30 in -20°C), za farmacevtske in biološke materiale pri medicinskih raziskavah pa tlake med 0,02 in 0,2 mbar (torej med -55 in -35°C). Izjemoma sušijo zelo počasi tudi pri nižjih temperaturah, vendar le majhne količine v laboratoriju.

Navedeni podatki se nanašajo na parcialni tlak vodne pare, ki ga je treba med sušenjem stalno vzdrževati na mestu sublimacije. Ker gre pri tem za ogromne volumne pare (1 kg ledu da že pri 0,1 mbar čez 10.000 m<sup>3</sup> pare), je treba uporabiti primerno zmogljivo črpalko. Navadno uporabimo kondenzatorje, hlajene vsaj za kakih 20°C nižje od sublimacijske temperature. Gonilna

sila za sublimacijo je namreč razlika med parnim tlakom ledu na mestu sublimacije in parcialnim tlakom vode v sušilniku. Dodatno pa potrebujemo še mehansko črpalko, da izčrpamo iz naprave zrak in potem vzdržujemo njegov parcialni tlak vsaj pod 0,1 mbar (kompenziramo eventualne netesnosti in razplinjevanje materiala), da ne ovira transporta pare. Hitrost, s katero lahko difundira vodna para v plinu pri atmosferskem tlaku, je npr. velikostnega reda cm/s, pri tlaku pod 0,1 mbar pa okrog 100 m/s.

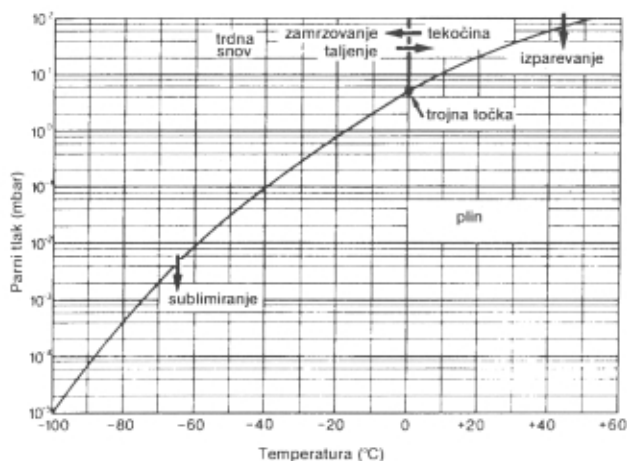
Maksimalna količina, ki lahko sublimira s površine ledu pri absolutni temperaturi T, pri kateri je ravnotežni parni tlak p, je podana z znanim izrazom za molekularno destilacijo:

$$w[\text{g/cm}^2\text{s}] = 4,38 \cdot 10^{-2} p[\text{mbar}] \cdot \sqrt{M/T} \quad (4)$$

Za praktično uporabo smo ga podali v posebnih enotah, za M pa je treba vstaviti 18 (relativna molekularna masa vode). Za čisti led pri -25°C dobimo npr.  $5,9 \times 10^{-3} \text{ g/cm}^2\text{s}$ , pri -40°C pa  $1,22 \times 10^{-3} \text{ g/cm}^2\text{s}$ , kar pomeni za 1 m<sup>2</sup> v eni uri že 44 kg ledu. Dejansko to v našem primeru ni dosegljivo, ker molekule pare trkajo med seboj in na toplejše površine ter se deloma vračajo. Še slabše je v kasnejši fazi sušenja, ko mora para prodirati skozi porozno suho snov.

Za proces je potrebna sublimacijska toplota okrog 2900 kJ na kg ledu, ki jo je treba sproti nadomeščati, sicer bi se temperatura produkta znižala in proces skoraj ustavil. Produkt je treba ogrevati, a tako, da z gotovostjo izključimo vsako prekoračitev dovoljene temperature v ledenem jedru. Odtajanje preparata pomeni skoraj vedno njegovo uničenje. Če prekoračimo evtektično področje, pride do delnega taljenja v drobnih področjih in do ustvarjanja koncentriranih raztopin, ki lahko poškodujejo občutljive snovi. Lahko pride celo do vrenja in kipenja materiala; živila npr. izgubijo bistvene sestavine (vitamine, aromatske spojine, barvila). Zato je treba precizno določiti področje temperature, ki zagotavlja vso varnost, hkrati pa zadostno hitrost (ekonomičnost) sušenja. Pri liofilizaciji mleka je to področje med -28°C in -14°C (pri -28°C se že javlja začetno taljenje, vendar nastopijo resne okvare šele nad -14°C); pri grozdnem soku pa je delovno področje med -45 in -20°C /6/. Pri farmacevtskih produktih so zahteve bolj ostre. V večini primerov je dopustna neka minimalna količina tekoče snovi, kar se določa empirično. Vzorce za histološke preiskave pa je treba držati pri veliko nižjih temperaturah, saj že pri -70°C pride zelo hitro do rekristalizacije in tvorbe večjih kristalov /1/.

Pri majhnih vzorcih in napravah lahko prihaja toplota od okolice, pri večjih je treba segrevati električno ali bolje s kroženjem tekočine. V zadnjih dveh primerih je treba gretje skrbno regulirati. Najbolje je voditi proces avtomatično na osnovi danih zahtev ob sproti kontroli temperature produkta, o tem pa kasneje. Toplota prihaja v produkt najpogosteje s prevajanjem od podlage skozi zamrznjeno ali posušeno plast, delno tudi s sevanjem. Pri tem pa lahko zelo pomaga prevajanje skozi razredčeno paro. Iz tega razloga navadno ni dobro imeti v napravi čim nižjega tlaka, ampak je treba odčrpavanje optimirati tako, da je tlak dovolj visok, a da vendar ne pride do zastoja pare v produktu. Preva-

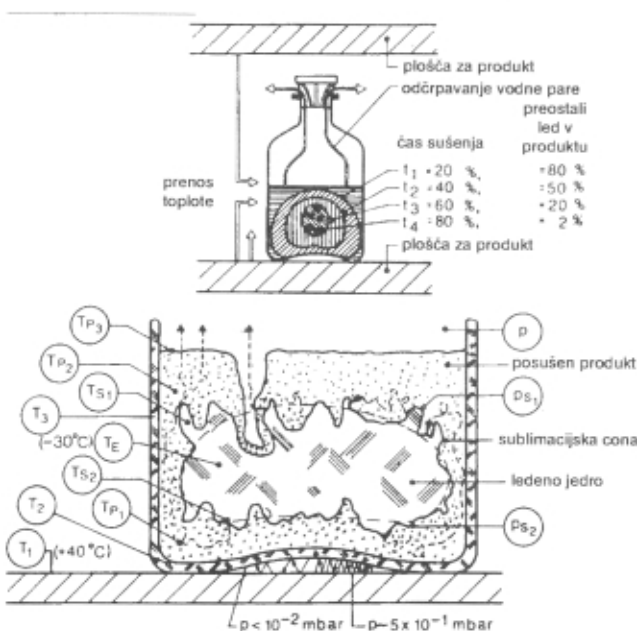


Slika 2. Fazni diagram za vodo



janje skozi paro je posebno važno pri ogrevanju skozi suho plast, ki ima slab toplotni stik z ogrevno površino in sama po sebi zelo majhno toplotno prevodnost. Tudi prehod toplote od podlage na dno steklenic je občutno boljši pri višjem tlaku /3,4/.

Sublimacije pa ne omejuje samo prenos toplote. Ko se sublimacijska fronta umakne v globino produkta, je lahko transport pare skozi porozno suho snov tako oviran, da začne omejevati sublimacijo. V nadaljnjem bomo tak primer, ki nastopi pri ogrevanju skozi zamrznjeno plast, podrobno opisali. Tedaj smo prisiljeni omejiti dovod toplote na vrednost, ki je potrebna za dani pretok pare pri predpisanem tlaku na fronti sublimacije, sicer bi prišlo zaradi zmanjšane porabe do dviga temperature in taljenja. Tudi to nalogo lahko opravlja avtomatika.



Slika 3: Sublimacijske cone; prenos vodne pare in sublimacijska toplota ( $T_1$ - temperatura police,  $T_E$ - temperatura ledene sredice,  $T_P$ - temperatura posušenega produkta,  $T_S$ - sublimacijska temperatura,  $p$ - tlak,  $p_s$ - tlak v sublimacijski coni)

## 2.2 Teorije hitrosti sušenja

Literatura večinoma navaja, da je hitrost sušenja ponavadi omejena z možnostjo dovajanja toplote na mesto sublimacije, saj se moramo pri večanju temperaturne razlike ozirati na temperaturo, ki jo še prenese material brez škode. Pri ogrevanju skozi suho snov, ki ima zelo majhno toplotno prevodnost, si lahko dodatno pomagamo z vzdrževanjem višjega tlaka v napravi. V nekaterih primerih pa je hitrost sušenja omejena prvenstveno s pretočno upornostjo, ki jo daje suha plast pri izhajanju pare iz mesta sublimacije v globini. Da se bomo lažje orientirali pri presoji vloge posameznih parametrov, moramo razumeti ustrezno teoretično ozadje.

Poglejmo najprej le vlogo prevajanja toplote (skozi zamrznjeno ali suho plast). S toplotnim tokom je povezan krajevni in časovni potek temperature v snovi in hitrost odparevanja ali hitrost napredovanja fronte

sublimacije. Kot smo že omenili pri zamrzovanju, je nestacionarni problem prevajanja ob upoštevanju spremembe agregatnega stanja splošno rešen /6/ za primer polneskončne plasti  $x > 0$  s predpisano (sublimacijsko) temperaturo na meji med fazama in na ravnini  $x=0$  (grelna plošča). Tu bomo problem le opredelili in podali rezultate /7/.

Naj bo sprva vsa snov zamrznjena in pri primerni temperaturi sublimacije, ki jo bomo vzeli za ničlišče temperaturne skale, torej  $\theta=0$ ; temperature, računane od nje navzgor, bomo označevali s  $\theta$ . Ob času  $t=0$  spravimo grelno ploščo pri temperaturi  $\theta_1$  v stik z mejo produkta v ravnini  $x=0$  in tam potem ves čas vzdržujemo to temperaturo. Začne se sublimacija (para naj uhaja npr. skozi luknjice v plošči), fronta sublimacije se premika na desno in njeno koordinato označimo z  $X$ , ki je funkcija časa. Teorija pokaže, da ima obliko:

$$X = \beta \sqrt{t} \quad (5)$$

Sorazmernostni faktor  $\beta$  je treba ugotoviti iz dodatnih pogojev problema. Temperatura  $\theta$  v suhi plasti je od  $t=0$  naprej odvisna od koordinate  $x$  in časa  $t$ :

$$\theta = \theta_1 \left[ 1 - \frac{\text{erf}(x / 2\sqrt{\kappa t})}{\text{erf}(\beta / 2\sqrt{\kappa})} \right] \quad (6)$$

Z erf označujemo integralsko funkcijo, znano v teoriji verjetnosti in teoriji pogreškov (error function, integral verjetnosti, Fehlerintegral). Konstanta  $\kappa$ , rečejo ji kar »diffusivity«, pomeni razmerje med toplotno prevodnostjo in produktom gostote in specifične toplote suhega materiala, torej  $\lambda/\rho c$ . Pri problemih transporta toplote ima enako vlogo kot difuzijska konstanta pri matematično enakih problemih difuzije snovi. Tik ob grelni plošči je za vsak končen čas  $\theta = \theta_1$  (erf za majhen argument je skoraj nič), tik pri fronti pa sta števec in imenovalc v (6) enaka, torej  $\theta=0$ .

Še neznan  $\beta$  lahko izračunamo npr. iz naslednjega sklepanja. Da se meja premika s hitrostjo  $dX/dt$ , je treba dovajati na ploščinsko enoto toplotno moč:

$$Q = L\rho(dX/dt)$$

kar je ob upoštevanju enačbe (5) dalje enako:

$$Q = \frac{L\rho\beta^2}{2X}$$

Tu je  $L$  specifična sublimacijska toplota. Ta toplotna moč prihaja na fronto s prevajanjem skozi suho plast:

$$Q = \lambda \frac{\partial \theta}{\partial x}$$

Odvod ( $\partial \theta / \partial x$ ) na mestu  $x=X$  izračunamo s parcialnim odvajanjem izraza v enačbi (6). (Za odvajanje erf uporabimo ustrezno pravilo za določene integrale z odvisno mejo). Iz izenačenja obeh izrazov za  $Q$  se potem po krajšem računu (pri katerem smemo  $\text{erf}(\beta/2\sqrt{\kappa})$

nadomestiti s prvima členoma potenčne vrste, ker je argument v praktičnih primerih majhen) dobi:

$$\beta^2 = \frac{2\theta_1\lambda}{\frac{\theta_1\lambda}{3\kappa} + L\rho} \quad (7)$$

Potem lahko na osnovi enačbe (5) izračunamo tudi čas, potreben za sušenje plasti do debeline  $d$ :

$$t_d = d^2/\beta^2 \quad (8)$$

Onstran  $d$  smo sicer predpostavili do neskončnosti še zamrznjen material, a ta pri procesu, kot je pač zastavljen (namreč, da je njegov  $\theta$  identično nič), sploh ni udeležen in ga lahko odmislimo. Toplota, ki se pri tem porabi (na enoto ploskve), je seve  $L\rho d$ , povprečna toplotna moč v vsem času  $t_d$  pa  $L\rho\beta^2/d$ .

Popolnoma enak račun avtor /7/ uporablja tudi za ogrevanje skozi zamrznjeno plast. Ta se ogreva s kontaktom z grelno ploščo pri  $x=0$ , seveda z veliko nižjo temperaturo  $\theta_1$ , ki mora biti pod temperaturo evtektičnega taljenja, a še vedno nad temperaturo sublimacijske fronte. Formalno enake rezultate dobimo, če štejemo čas od trenutka, ko fronta sublimacije že doseže grelno ploščo; tedaj so vsi zanimivi časi negativni. Tudi zdaj se vzame, da je temperatura na fronti sublimacije  $\theta=0$  in enako tudi za vso suho snov desno od fronte. (Če je problem tako zastavljen, v suhi plasti ni nobenih sprememb več in jo lahko od  $d$  naprej mirno odmislimo; s tem tudi odpade vprašanje, kam naj gre para, saj skozi neskončno plast res ne bi mogla.) Seveda je treba v rezultate vstaviti konstante za zamrznjeno snov.

Avtor /7/ je tako izračunal hitrost sušenja (izraženo kot srednja toplotna moč) za realen primer plošč ( $d=12,7$  mm) zamrznjene govedine (pri  $-20^\circ\text{C}$ ). Privzet je odličen toplotni stik z grelno ploščo, da ga v računu ni treba upoštevati. Pri gretju skozi zamrznjeno plast pri temperaturni razliki  $\theta_1$  komaj  $5^\circ\text{C}$  je dobil blizu  $2 \text{ kW/m}^2$ , pri  $10^\circ\text{C}$  dvakrat več. Pri gretju skozi suho plast pa je celo za sušenje z obeh strani in  $\theta_1$  kar  $50^\circ\text{C}$  dobil zaradi slabše toplotne prevodnosti tudi samo  $2,06 \text{ kW/m}^2$ . Po tej teoriji je torej ogrevanje skozi zamrznjeno plast lahko nekajkrat hitrejše za sublimacijo pri isti temperaturi.

V praksi pa so dosegli pri gretju skozi zamrznjeno plast nekajkrat manjšo hitrost sušenja, torej jo omejuje drug mehanizem. Gre za to, da hladna para le težko prodira skozi porozno snov pri nizki temperaturi (enaki sublimacijski), ker prihaja v ozkih kapilarah do rekondenzacije. Upornost plasti proti toku pare je tako velika, da pri dani tlačni razliki med mestom sublimacije in med zunanjščino produkta ne more biti toliko pare, kot bi je ogrevanje lahko proizvajalo. Ne preostane drugega, kot ogrevanje ustrezno zmanjšati, da ne pride do pretiranega dviga temperature zmrznjene snovi.

Pretok pare pa je veliko manj oviran pri ogrevanju skozi suho snov, ki ima precej višjo temperaturo. V tem primeru se para na poti skoznjo pregreje in se potem vede kot navaden plin. Gre za pretakanje v vmesnem področju med molekularnim in laminarnim. Tak pretok opišemo s kombinirano, napol empirično formulo, v

kateri nastopata (poleg skupnega faktorja - tlačne razlike) dva sumanda, ki zajemata molekularni (neodvisen od tlaka) in viskozni delež (sorazmeren srednjemu tlaku). Tu ne bomo sledili avtorju, ker v članku /7/ ni dovolj podatkov. Povzamemo le rezultat za enako sušenje, kot je opisano zgoraj (torej sublimacija pri  $-20^\circ\text{C}$ , kjer je parni tlak  $0,8$  mbar, medtem ko je za tlak v komori vzeta 10-krat nižja vrednost, grelna površina pa je pri  $+30^\circ\text{C}$ ): masni pretok pare je  $6,8 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^2\text{s}$ . Temu ustreza ogrevna moč  $1,89 \text{ kW/m}^2$ . V primerjavi z zgoraj dobljeno močjo ( $2,06 \text{ kW/m}^2$ ) pomeni to samo 10% padec. V tem primeru torej pretočna upornost suhega sloja ne omejuje bistveno sušenja. Tako je v praksi dejansko mogoče doseči skoraj 4-krat večjo hitrost sušenja, kot je maksimalno možna z ogrevanjem skozi zamrznjeno plast.

Poglejmo še drugačen, bolj enostaven način za izračunavanje hitrosti sušenja, pri katerem ne upoštevamo toplotne kapacitete produkta. Dejansko je vpliv ogrevanja ali hlajenja mase dokaj zanemarljiv v primerjavi z veliko sublimacijsko toploto. Za prakso ta aproksimacija navadno zadošča, saj tako nimamo prav natančnih podatkov. Tako se izognemo težkemu nestacionarnemu problemu in ga nadomestimo s kvazi stacionarnim, pri katerem pa lahko upoštevamo še druge realne okoliščine /8/.

Vzemimo sušenje ravne plošče debeline  $d$  z ogrevanjem skozi suh produkt v kontaktu z grelno ploščo na dnu (na mestu  $x=0$ ) s stalno temperaturo  $T_D$ . Para naj uhaja skozi zmrznjeno plast, ki mora biti sipka (granulat). Tokrat upoštevamo koeficient prenosa toplote  $\alpha$  z grelne plošče na produkt, tako da je temperatura mejne plasti produkta  $T_H$  podana z zvezo  $Q = \alpha(T_D - T_H)$ , kjer je  $Q$  spet ogrevna moč na ploščinsko enoto (=gostota toplotnega toka). Sublimacijska fronta ima  $T_S$ , njena koordinata  $x$  raste in končno doseže  $d$ . Tok pare  $w$  (masa na enoto ploščine in časa) mora skozi zamrznjen granulato, žene pa ga razlika tlakov ( $p_S - p_K$ );  $p_S$  je nasičen parni tlak, ki ustreza  $T_S$ ,  $p_K$  pa je tlak v komori in naj mu ustreza temperatura površine produkta  $T_K$ . Naj velja  $w = \Delta p \cdot b / (d - x)$ , torej ima  $b$  vlogo nekakšne specifične pretočne prevodnosti granulata. Kot primer podaja avtor vrednost  $b = 0,013 \text{ kg/m h mbar}$ . (To je najbrž le neko povprečje, ker menimo, da  $b$  ne more biti vseskozi konstanten, temveč je odvisen tudi od  $p$ . Razen tega pogrešamo utemeljitev, da v zamrznjeni plasti ne pride do kondenzacije pare, ki bi učinkovito  $b$  dodatno modificirala.)

Če je masa zaledenele plasti na ploščinsko enoto  $G$ , v njej pa je delež  $\xi$  čistega ledu, je  $w = -\xi dG/dt$  in  $Q = wL$  ( $L$  = specifična sublimacijska toplota). Ker je  $G = \rho(d - x)$ , kjer je  $\rho$  gostota granulata s porami vred, je torej:

$$Q = \rho \xi L dx/dt \quad (9)$$

Ta toplotni tok napravi na svoji poti padca temperature:

$$T_D - T_H = \frac{Q}{\alpha} \quad \text{ter} \quad T_H - T_S = Q \frac{x}{\lambda} \quad (10)$$

$\lambda$  je toplotna prevodnost suhe snovi. Nadaljnji padec do  $T_K$  bomo morali izraziti s tokom pare. Problem je tako zastavljen, da sta vnaprej predpisana  $T_D$  in  $p$ ,

vmesne temperature in tudi  $Q$  pa se v teku časa spreminjajo. Zaradi povezave med  $w$  in  $Q$  lahko padec tlaka  $\Delta p$  izrazimo s  $Q$ :

$$p_s - p_k = (d-x) \frac{Q}{Lb} \quad (11)$$

Pripadajoči padec temperature moramo poiskati iz odvisnosti parnega tlaka od temperature. Za manjše intervale velja eksponentna odvisnost ali  $\ln p = A - (B/T)$ , odkoder  $dp = p(B/T^2) \cdot dT = \exp(A - B/T) B dT/T^2$ . Od tod lahko izrazimo iskani  $dT$  z diferenco tlaka  $dp$ , ki jo vzamemo iz (11), in dobimo

$$T_s - T_k = \frac{d-x}{Lfb} Q \quad (12)$$

kjer smo s črko  $f$  označili  $(B/T^2) \exp(A - B/T)$ .

Posamezni padci iz (10) in (12) se seštevajo v skupni padec  $T_D - T_k$ , ki ostane ves čas konstanten. Z njim lahko izrazimo  $Q$  in potem iz (9) še:

$$\frac{dt}{dx} = \frac{\rho \xi L}{T_D - T_k} \left( \frac{1}{\alpha} + \frac{x}{\lambda} + \frac{d-x}{Lfb} \right)$$

z integracijo te enačbe pa čas sušenja do nivoja  $x$ :

$$t_x = \frac{\rho \xi L}{T_D - T_k} \left( \frac{1}{\alpha} + \frac{x}{2\lambda} + \frac{d-x/2}{Lfb} \right) \cdot x \quad (13)$$

V nekem praktičnem primeru, ki ga avtor navaja ( $\lambda = 0,023$  W/mK) je najmočnejši linearni člen v (13); torej velja kvadratna odvisnost, ki jo zahteva enačba (8), le v poenostavljenih posebnih primerih.

Popolnoma podoben račun lahko naredimo za ploščo, ki se ogreva skozi zamrznjeni sloj iz za paro neprepustnega materiala, suši pa se z vakuumske strani. Para uhaja skozi suho porozno plast, sublimacijska meja pa se seli od vrha ( $x=0$ ) do grelne plošče ( $x=d$ ). Zdaj je  $\lambda$  zamrznjene plasti od 20- do 100-krat večja in tudi  $\alpha$  je večja. Pri enaki celotni razliki  $T$  bi bilo torej sušenje precej hitrejše. Toda to bi lahko v prejšnjem primeru kompenzirali z višanjem  $T_D$ , ko se sublimacijska fronta odmika. Poleg snovnih konstant ( $\alpha, \lambda, b$ ) je zdaj razlika samo še v pomenu koordinate  $x$ , sicer pa je rezultat analogen (13):

$$t_x = \frac{\rho \xi L}{T_D - T_k} \left( \frac{1}{\alpha} + \frac{d-x/2}{\lambda} + \frac{x/2}{Lfb} \right) x \quad (14)$$

### 3 Sekundarno sušenje in zaščita

Konec sublimacije spremlja bolj ali manj očiten padec tlaka. Najlaže to ugotovimo s kratko ločitvijo komore od črpalk. Nekatere naprave imajo v ta namen nameščene majhne vetrnice, ki jih parni tok obrača; ko usahne, se ustavijo. Konec je možno ugotoviti tudi z natančnim spremljanjem temperature v produktu, kar pa je težko, saj ima suh produkt zelo majhno toplotno kapaciteto.

Lahko spremljamo tudi porast električne upornosti v reprezentativnem vzorcu.

Ko led izgine, lahko produkt brez škode postopno segrejemo do sobne temperature ali celo malo bolj (od 30 do 40, včasih tudi do 60°C, odvisno od produkta), močno gretje, ki je bilo potrebno za sublimacijo, pa je treba pravočasno prekiniti. Zdaj je treba odstraniti preostalo vlago, ki je vezana s fizikalno in šibko kemijsko adsorpcijo. Ta perioda je precej dolgotrajna in nima določenega konca. Doseči je treba določeno residualno vlažnost, optimalno za tisti produkt glede na dobo konzervacije in na ekonomiko. Od te vlažnosti je odvisna trajnost produkta, a tudi potrebna kvaliteta pakiranja; za hranjenje nekaj mesecev je manjša kot za več let. Navadno se giblje med 2 in 0,5% suhe mase. Preveč pa tudi ni dobro dehidrirati, saj mora v makromolekulah ostati sestavna voda.

Zelo važno je, da za higroskopične produkte poznamo sorpcijske izoterme, ki so ena od njihovih karakteristik. V ravnovesju je vsebnost vode v produktu (masni procent vlage) povezana s parcialnim tlakom vodne pare ali z relativno vlažnostjo atmosfere nad njim (t.j. razmerje dejanskega in nasičenega parnega tlaka). To zvezo podajajo sorpcijske izoterme za posamezne temperature (pri višjih temperaturah potekajo nižje, t.j. pripada jim nižja vsebnost vode). V splošnem imajo obliko ležečega S /3,9/: pri višanju tlaka vsebnost vode sprva hitro narašča (do enomolekularnega pokritja površin), nato bolj počasi, končno pa spet hitro, ko proces preide v navadno kondenzacijo. Potek dobro podaja znana Brunauer-Emmet-Tellerjeva enačba za ravnovesno adsorpcijo, njene konstante pa so za mnoge produkte objavljene. Večkrat je zaželeno, da ostane na produktu enomolekularna plast vode, ki ga ščiti pred možno oksidacijo (živila, ki vsebujejo maščobe).

Da pride do desorpcije preostale vlage, je treba tlak vodne pare znižati pod ravnovesnega, in to čim globlje, da proces hitreje napreduje. Kondenzatorju bi morali znižati temperaturo pod -70°C, kar (pri večjih napravah) ni ekonomično. Rotacijska črpalka ne seže dovolj globoko, ker ji blizu njenega končnega tlaka upade črpalna hitrost proti nič. V poštev pride difuzijska črpalka, vendar je treba prej kondenzator ločiti od sušilne komore, saj bi se sicer prečrpaval led. Navadno zadošča, da vzdržujemo nad produktom vakuum od 1 do  $7 \times 10^{-3}$  mbar nekaj ur (do 12). Sekundarno sušenje pa je možno izvajati tudi v drugi posodi za adsorbentom ( $P_2O_5$ ), iz katere izčrpamo zrak /1/.

Vsebnost residualne vlage je možno spremljati med samim sušenjem. Z nekajminutnim ločenjem komore od črpalke ugotovimo ravnotežni tlak pare in nato odčitamo vsebnost na izotermi. Mogoče je tudi ugotavljati rosišče z opazovanjem zameglitve testne površine v komori, ki jo stopnjevano ohlajamo /6/.

Spremembe, do katerih pride v produktu med hranjenjem in ki so odvisne od vsebnosti vode v njem, so fizikalne, kemične (oksidacijsko in hidrolitično razkranjanje maščob, včasih ob sodelovanju encimov, neencimatska porjavitev) in biološke (razvoj plesni, gliv, bakterij). Ti vplivi pa so lahko odvisni tudi od parcialnega tlaka kisika in od osvetlitve /9/. Vlage mora biti vsaj tako malo, da bo relativna vlažnost v paketu ali posodi, v kateri je produkt shranjen, gotovo pod 60%

tudi pri najnižji možni temperaturi, ki lahko nastopa. Merilo za to je sorpcijska izoterma. Sicer bi prišlo pri lokalnih podhladitvah do koncentracije vlage in z njo povezanih sprememb /10/.

Po končanem sušenju ne smemo vpustiti v komoro atmosferskega zraka. Le včasih (pri nekaterih živilih) je dovoljen suh zrak, ki ga uvedemo skozi sušilno patrono ali ga sušimo s tekočim dušikom /3/, ali pa je dovoljeno pakiranje v klimatiziranem prostoru z nizko relativno vlago. Bolj suhi produkti so tudi bolj občutljivi za oksidacijo in tedaj je treba uporabiti zaščitni plin ( $N_2$  ali Ar). Vzorce za preiskavo je treba dajati v steklenice z brušenim zamaškom, osušene pri  $105^\circ C$  in hranjene v eksikatorju.

Framacevske produkte v steklenicah lahko zamašimo kar v sušilni komori pod vakuumom ali inertnim plinom. Komore s ploščami za steklenice so lahko opremljene s hidravličnimi zapiralnimi napravami, ki stisnejo plošče skupaj in s tem potisnejo posebne gumijaste zamaške v steklenice. Zamaški imajo na spodnjem delu, s katerim jih že pred liofilizacijo nastavijo na odprtine steklenic, zareze za črpanje. Pri majhnih napravah lahko zapremo posodo pod vakuumom tudi s prevodnico za linearno gibanje. Stekleničke ali ampule s prašnatim produktom je bolje delno napolniti s plinom, da pri odpiranju vdor zraka ne razprši prahu. Če pa ima vrat ampule dvojno zožitev z eventualnim vmesnim bakterijskim filtrom, je dopusten tudi vakuum. Ampule preprosto odtalimo s plinskim gorilnikom.

Uporabljajo se tudi drugi načini pakiranja. Prepustnost embalaže za vodo in kisik mora biti v skladu z zahtevami produkta in načrtovano dobo hranjenja. Zlasti za živila pride v poštev hermetično zapiranje v kovinske doze ali plastične vrečke. Pokrov trdnih posod se privari ob pritisku ali pa ima tesnilo. Vrečke so lahko iz Al-folije, ki jo je mogoče variti z ultrazvokom, sicer pa zahtevajo notranjo plast iz umetne snovi, ki se zvari pri nižji temperaturi. Zunaj je lahko tudi papir ali plastična folija. Namesto Al se uporablja tudi poliester, polietilen, poliviniliden. Šiv mora biti primerno širok, da je dovolj

tesen. Patentiran je princip, da produkt sušijo v odprtih vrečah (t.i. sekundarnih posodah), ki jih potem zaprejo (mehansko ali termično) pred odvzemom iz komore.

Embalaža mora izpolnjevati več zahtev; poleg tesnosti in zvarljivosti še mehansko odpornost, indiferentnost do produkta in večinoma tudi neprepustnost za svetlobo. V splošnem lahko vse to dosežemo le s kombinacijo folij. Poleg aluminija z umetno snovjo obstajajo tudi prozorne kombinacije. Navadno so vsaj trije sloji: notranji zvarljivi, zunanji nosilni in dodatni tesnilni (pogosto med prvima). Zadnji je npr. iz polivinilidenklorida ali iz aluminija, ki je najbolj neprepusten. Zvarljivi sloj je največkrat iz polietilena.

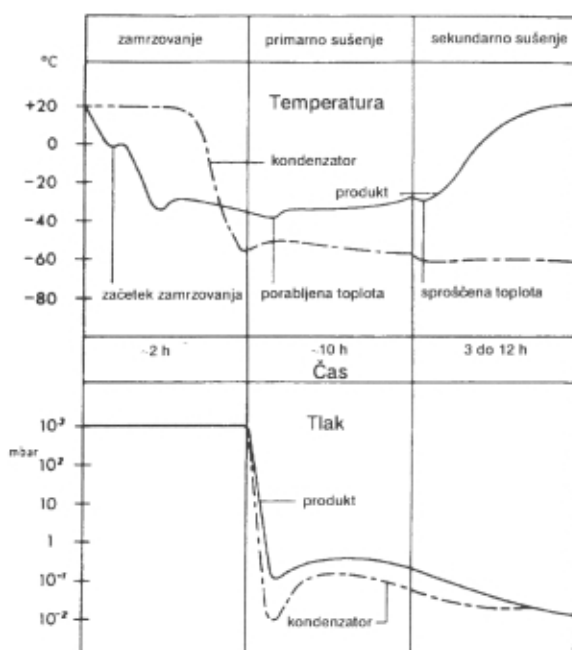
Tesnost, ki jo imajo papirji s polietilensko prevleko, že za živila redko zadošča (koncentracija  $O_2$  v vrečki že po dveh dneh doseže 2%). Prepustnost ne sme biti večja kot 5 mg kisika na dan na  $m^2$ . Za vlago ni tako strogo, morda 50 mg. Embalaža iz vezanih folij aluminij-umetna snov je veliko boljša: po enem letu so v politrski vrečki ugotovili komaj merljiv porast vode in 0,2 do 0,3% porast kisika /10/.

## 6 Sklep

V prispevku smo obdelali fizikalne in kemijske mehanizme pri zamrzovanju, ki so komplicirani že pri sestavljenih vodnih raztopinah, še bolj pa ob prisotnosti velemolekul in koloidnih snovi. Posebej smo se zadržali pri škodljivih vplivih dehidracije in koncentracije elektrolitov na komplicirane organske snovi in na žive celice. Ker je za konstrukcijo naprav in razvoj tehnologije važen kvantitativni opis procesa zamrzovanja, smo prikazali poenostavljen način računanja ter navedli orientacijske podatke za različne praktične primere. Nakazali smo tudi različne metode zamrzovanja, njih prednosti in pomanjkljivosti. V samostojnem poglavju smo opisali proces sušenja s sublimacijo in matematično obravnavo procesa sušenja. Predstavili smo vlogo snovnih parametrov in jo ponazorili s številskimi primeri. Opisali smo tudi postopek sekundarnega sušenja, zapiranja in pakiranja.

## 7 Literatura

- /1/ L. Rey, Le Vide, 98, 1962, 134
- /6/ L. Rey, Le Vide, 101, 1962, 428
- /3/ P. Haseley, Freeze-drying in the fields of pharmacy and biology, Int. symp. on freeze drying, Manila, 1977
- /4/ H. Willemer, Sonstige Anwendungen und die künftige Entwicklung der Gefriertrocknung, Lehrgangshandbuch Gefriertrocknung, DAG Vakuum, Düsseldorf, 1972
- /2/ G. Steinbach, Die Bedeutung des Einfriervorgangs, Lehrgangshandbuch Gefriertrocknung, DAG Vakuum, Düsseldorf, 1972
- /4/ H.S. Carslaw, J.C. Jaeger, Conduction of heat in solids, 2<sup>nd</sup> Ed., Oxford Univ. Press, 1959
- /7/ J.D. Mellor, Vapour phase conditions in freeze-drying, Trans. of Vac. Symp. 1961 (Commonwealth Sci. and Res. Organization, Australia), 1064
- /5/ H. Willemer, 1979, brošura podjetja Leybold
- /8/ G. Steinbach, Wärmeübertragung und Stofftransport bei der GT, Lehrgangshandbuch Gefriertrocknung, DAG Vakuum, Düsseldorf, 1972
- /9/ G. Kluge, Haltbarkeit und Sorptionsverhalten gefriergetrockneter Produkte, Messung von Sorptionsisothermen, Lehrgangshandbuch Gefriertrocknung, DAG Vakuum, Düsseldorf, 1972
- /10/ K. Domke, Verpackung und Lagerung gefriergetrockneter Produkte, Lehrgangshandbuch Gefriertrocknung, DAG Vakuum, Düsseldorf, 1972



Slika 4: Potek temperature in tlaka med liofilizacijo



## OSNOVE LIOFILIZACIJE (III. del)

Bojan Povh<sup>1</sup>, 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  $-80^{\circ}\text{C}$ . 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  $-50^{\circ}\text{C}$  in pri debelini plasti produkta okrog 10 mm je mogoče doseči hitrosti ohlajanja največ  $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . 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  $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  okrog  $4\ \mu\text{m}$ , je pri  $30^{\circ}\text{C}/\text{min}$  le še  $1\ \mu\text{m}$ .

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

<sup>1</sup> 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.



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 m<sup>3</sup> pare, torej mora biti učinkovita črpalka hitrost kondenzatorja 3500 l/s. Sam kondenzator sicer to zahtevo precej presega, saj ima več tisoč cm<sup>2</sup> kondenzacijske površine, vsak cm<sup>2</sup> 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 0,5m<sup>2</sup>), 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. Nekatero 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 protičnem menjalniku ali ogrevajo s pretočnim grelcem. Kot medij se je najbolj obneslo silikonsko olje nizke viskoznosti. Hitrost hlajenja prilagodimo produktu – od  $0,2$  do  $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

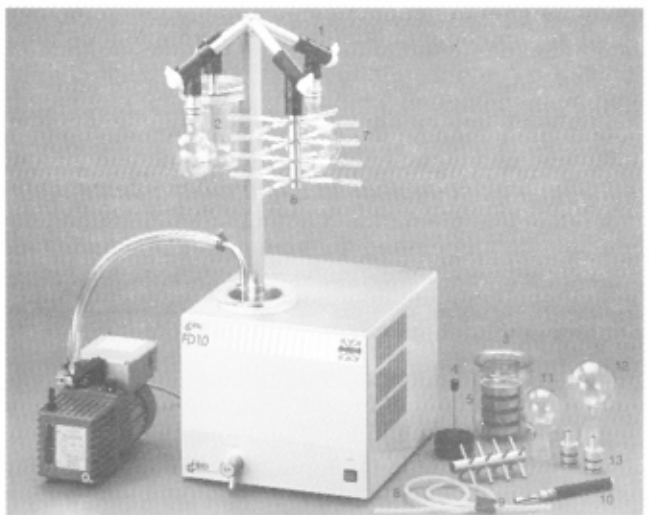
#### e) Zahteve pri sušenju

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  $-40^{\circ}\text{C}$  do pare pri  $0^{\circ}\text{C}$ ) potrebna ogrevalna moč  $740\text{ W}$ . 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  $\Delta p$  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  $60^{\circ}\text{C}$ ). 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  $-70^{\circ}\text{C}$ . Ta je zdaj toplotno le malo obremenjen in lahko doseže svoj temperaturni ekstrem.

Za zelo suh produkt je potreben vakuum  $10^{-3}\text{ mbar}$  in trajanje črpanja  $12\text{ ur}$ . 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  $\text{P}_2\text{O}_5$  (ki se zamenja) ali zeolitom (ki se da regenerirati pri  $250^{\circ}\text{C}$  ob prepihanju s suhim zrakom). Zlasti prva snov je zmožna posrkati paro do zelo nizkega tlaka (reda  $10^{-5}\text{ mbar}$ ). Tako past je treba priključiti med dva zaporna ventila – proti komori in proti črpalni. Med uporabo je treba past in skoznjo tudi komoro izčrpavati z mehansko črpalno, 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 prekristalizacije 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  $-39^{\circ}\text{C}$ , 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  $-21^{\circ}\text{C}$ , 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.

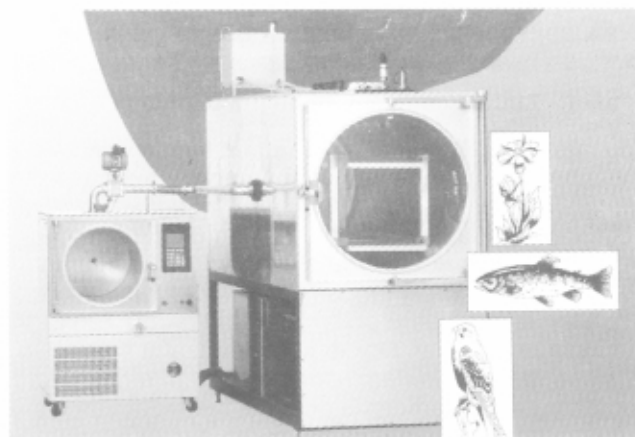
Na tej osnovi so razvili pri podjetju Leybold-Heraeus t.i. evtektični monitor, ki ga že dolgo prodajajo. Naprava ima merilno sondo z elektrodama (za izmenično napetost) in platinski uporovni termometer (električno izoliran), ki ju je treba vstaviti v vzorec. Za preiskovalne namene je treba imeti zraven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

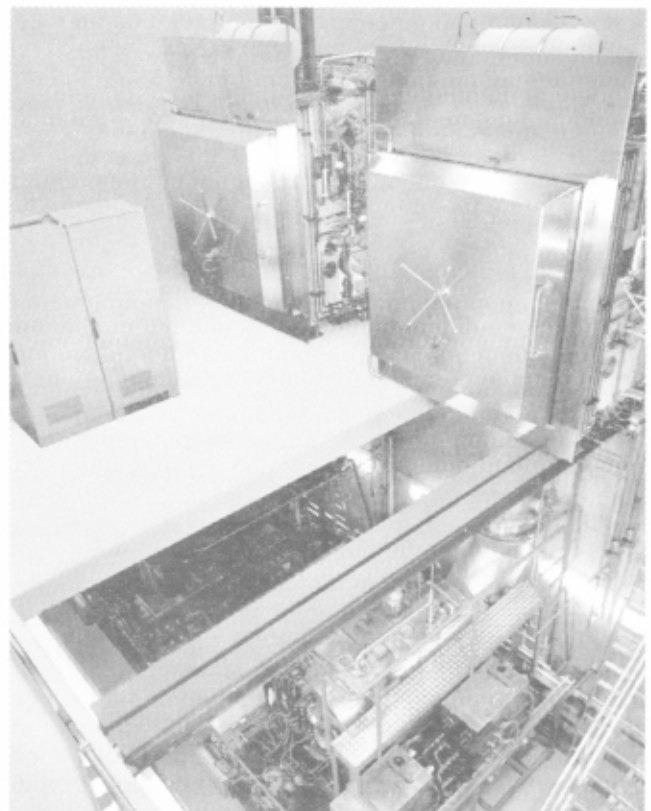
Po daljši uporabi pride v poštev umivanje naprave z antiseptičnimi sredstvi. Zato mora konstrukcija omogočati dostop do vseh notranjih delov komore. Bolj pogosto pa je potrebna hitra in preprosta sterilizacija naprave s kondenzatorjem in povezovalnim vodom vred. To se pri industrijskih napravah navadno 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  $5 \text{ mJ/cm}^2$  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.

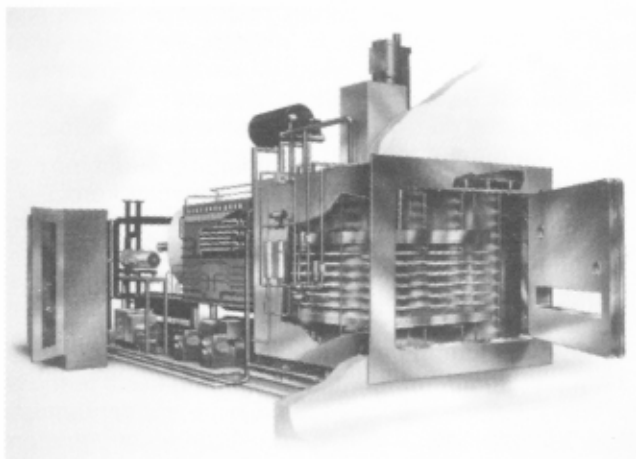
Etilenoksid ( $C_2H_4O$ ) ima vrelišče  $10^{\circ}C$ , v zraku se vname v širokih mejah od 3,6 do 60 vol.% in zato zahteva razredčenje npr. s  $CO_2$ . Je dokaj strupen – največja koncentracija v zraku (za dihanje) je 50 ppm. Za sterilizacijo uporabljajo koncentracije od 400 do 1000 mg/l, vendar je 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 ( $\text{CH}_3\text{Br}$ ) 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-propiolakton ( $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2$ ): kot brezbarvna tekočina vre pri  $163^\circ\text{C}$  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  $27^\circ\text{C}$  in 5 min pri  $50^\circ\text{C}$  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-propiolakton. 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  $40^\circ\text{C}$  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