冻干保护剂溶液低温退火特性的研究*

左建国 华泽钊 刘宝林 周国燕 胥 义

(上海理工大学低温医学与食品冷冻研究所, 上海 200093)

摘要 利用差示扫描量热仪(DSC)研究了 10%叔丁醇/10%蔗糖/水溶液的冻结特性, 退火温度及退火时间, 分析了溶液的退火行为. 实验结果表明, 溶液降温时, 蔗糖的存在阻碍了叔丁醇析出, 最大冻结浓缩溶液玻璃化转变温度 T_g' 由 $-32.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 降低到 $-42.0\text{ }^{\circ}\text{C}$, 升温时在 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 叔丁醇发生反玻璃化. 在反玻璃化峰附近的温度进行退火可使叔丁醇充分析出, T_g' 由 $-42.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 上升到 $-34.9\text{ }^{\circ}\text{C}$. 所需的退火时间与退火温度有关, 退火温度越接近 T_g' , 所需的退火时间越长. 在 $-37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, 退火 20 min 可完全消除反玻璃化.

关键词: 冷冻干燥, 叔丁醇, 蔗糖, 退火, 差示扫描量热法, 玻璃化转变, 反玻璃化

中图分类号: O645

目前真空冷冻干燥主要应用于热敏性食品、药品和活体细胞等生物制品的保存^[1-2]. 蔗糖属于非还原性二糖, 降温时不共晶而是发生玻璃化转变, 是一种有效的、最常用的冻干保护剂. 但是冻干过程干燥速率低, 时间长, 能耗巨大. 叔丁醇(tertiary butyl alcohol, TBA)是一种有机溶剂, 与水完全互溶, 具有低毒性、高粘度、高蒸汽压、高熔点, 常与水组成复合溶剂, 以溶解难溶于水的药物. 近年来发现冻干配方中加入少量叔丁醇后, 冻结时形成针状结晶, 冰晶升华后, 留下了管状通道, 使水蒸汽流动阻力大大减小, 升华速率显著提高, 因此受到各国学者的关注^[3-7]. Deluca 等^[3]利用差示扫描量热仪(differential scanning calorimeter, DSC)对叔丁醇/水溶液进行了热分析, 绘制了二元相图, 并测定了叔丁醇对干燥层传质阻力的影响. 但是, 添加叔丁醇也带来一些新问题, 叔丁醇的残余量就是其中之一. Nail 等^[5]在研究中发现: 降温过程中叔丁醇结晶不充分会导致冻干品中叔丁醇残余量增加. 同时, 他还发现蔗糖/水溶液中添加叔丁醇后, 玻璃化转变温度 T_g' 下降, 而且升温时出现放热峰, 他推测是叔丁醇结晶析出(反玻璃化), 但没有做进一步的研究. 我们认为, 叔丁醇结晶不充分还会产生其它方面的影响. 首先, 玻璃化转变温度 T_g' 下降将使升华干燥不得不在更低的温度下进行, 大大降低干燥速率; 其次, 如果残留于蔗糖中的叔丁醇冻干后仍然保持无定形,

那么可能在储存过程中结晶, 导致生物制品不稳定.

近来研究表明, 在升华干燥之前进行退火处理, 能够使降温过程中来不及析出的成份充分结晶, 从而解决上述问题^[8-9]. 退火是一个等温过程, 一般在 T_g' 以上的温度进行. 高才等^[10]研究了不同结晶度的乙二醇及其水溶液的玻璃化转变. 但目前尚未见到对叔丁醇/蔗糖/水溶液进行退火研究的报道.

本文利用 DSC 考察了蔗糖/水溶液在加入叔丁醇后 DSC 曲线的变化, 在此基础上, 研究了退火温度、退火时间对溶液冻结特性的影响.

1 材料和方法

蔗糖为分析纯试剂(上海生化试剂有限公司); 叔丁醇为气相色谱纯(瑞士 Fluka). 标定用的环戊烷为色谱标准试剂(上海生化试剂有限公司); 标定用水和溶液配制用水为二次蒸馏水.

实验采用的差示扫描量热仪是 DSC-Pyris Diamond (美国 Perkin-Elmer 公司). 温度标定采用环戊烷的晶-晶转变点(外推起始温度为 $-135.06\text{ }^{\circ}\text{C}$)和纯水(二次蒸馏)的熔点(外推起始温度为 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$)进行两点标定; 热焓标定采用纯水(二次蒸馏)的融化潜热($333.88\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$)进行单点标定. 冷却方式为液氮冷却, 样品冲洗气体为高纯度氦气(纯度 $>99.999\%$), 流量 $20\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 并保持不变. 为避免炉块结霜, 加样时用高纯度氦气冲洗炉块.

所有的溶液均以质量浓度配制,样品皿为标准液体铝皿,用液固通用压机(美国 Perkin-Elmer 公司)压制. 样品质量取 16.0~18.0 mg, 精确到 0.1 mg. 在参比侧放置与样品皿相同的空皿. 调至实验起始温度, 恒温 3~5 min, 待热流稳定后即可升温采集数据. 退火时将溶液从 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热到退火温度, 等温到设定的时间后, 降回到 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, 待热流平衡后升温采集数据.

转变温度与转变焓的读取采用热分析软件 Pyris Software(美国 Perkin-Elmer 公司, 5.0 版本). 由于相变前后比热变化不大, 所以均采用标准基线. 玻璃化转变温度 T_g' 取半比热温度, 在升温扫描时读取数据; 结晶温度取峰值. 考虑到扫描速率对测量结果稍有影响, 在进行温度标定时, 采用了仪器软件中的延迟补偿技术.

2 结果与讨论

2.1 叔丁醇/蔗糖/水溶液的冻结特性

我们曾经利用 DSC 详细考察了蔗糖/水二元溶液的冻结特性, 发现对于 10%蔗糖/水溶液, 当降温速率为 2 、 10 、 20 、 $40\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 时, 玻璃化转变温度 T_g' 无变化, 均为 $-32.5\text{ }^{\circ}\text{C}$, 而且升温时没有反玻璃化现象^[1]; 同时对 10%蔗糖/水溶液的退火情况进行了研究, 发现在 $-27\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 min 后, T_g' 仍不变, 表明此时溶液已经接近最大冻结浓缩.

Deluca 等^[9]利用 DSC 对各种浓度的叔丁醇/水二元溶液进行了热分析, 在此基础上绘制了二元相图. 他认为, 低浓度的叔丁醇/水溶液在 $20\%(w)$ 时发生共晶, 析出冰和叔丁醇水合物, 共晶温度为 $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

在研究叔丁醇/蔗糖/水三元溶液的冻结特性之前, 先考察了 10%叔丁醇/水二元溶液在不同降温速率时的结晶情况. DSC 实验表明, 叔丁醇本身极易结晶, 其水溶液即使在快速降温时, 如 $200\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, 叔丁醇也不会发生玻璃化转变, 而是与水发生共晶. 从图 1 可以看出, 升温时出现两个吸热峰, I 为叔丁醇和冰的共晶熔融峰, 熔融温度为 $-8.5\text{ }^{\circ}\text{C}$, 这与文献 [3] 的结果略有不同; II 为冰的熔融峰, 熔融温度 $-2.2\text{ }^{\circ}\text{C}$, 与文献 [3] 的结果相近.

10%蔗糖/水溶液中加入 10%的叔丁醇后, 以 $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 扫描时, T_g' 由原来的 $-32.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 降低到 $-42.0\text{ }^{\circ}\text{C}$, 同时升温曲线在 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右出现了放热峰, 见图 2. 前面已经提到, 10%蔗糖/水溶液降温时水分会充分结晶, 所以这个放热峰可能为叔丁醇结晶. 为了证明这一点, 我们采用 $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温, 但采用不同

图 1 10%叔丁醇/水溶液的升温 DSC 曲线

Fig.1 DSC heating thermogram of 10%TBA aqueous solution

cooling rate: $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$; heating rate: $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$

的降温速率, 相应的 DSC 实验结果见表 1. 当降温速率从 $1\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 逐渐升高到 $20\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 时, 水的结晶热基本保持不变, 而叔丁醇/水的共晶则因为降温过快而受到抑制, 表现为共晶热逐渐减小直至共晶峰消失, 但此时升温曲线仍有共晶熔融峰. 既然发生共晶熔融的晶体不会产生于降温过程, 那么只能在升温过程中产生. 因此, 放热峰为叔丁醇反玻璃化结晶, 其结晶热随降温增大而逐渐增大更加证明了这一点. 前面曾提到, 叔丁醇本身极易结晶, 叔丁醇/水二元溶液即使在快速降温时也会发生共晶. 而三元溶液的实验结果表明: 10%叔丁醇/10%蔗糖/水溶液降温时, 蔗糖的存在阻碍了叔丁醇结晶, 少部分叔丁醇存在于蔗糖玻璃体中, 使 T_g' 降低. 但是处于玻璃体中的叔丁醇极不稳定, 升温时发生反玻璃化.

从上面的结果可以看出, 对于三元溶液, 多种溶质之间相互作用, 使结晶情况变得复杂. 即使浓度较

图 2 10%叔丁醇/10%蔗糖/水溶液的升温 DSC 曲线

Fig.2 DSC heating thermogram of 10%TBA/10% sucrose/water solution

cooling rate: $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$; heating rate: $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$;

T_g' : glass transition temperature; T_d : devitrification temperatures

表 1 10%叔丁醇/10%蔗糖/水溶液在不同降温速率下的冻结特性

Table 1 Freezing properties of 10%TBA/10%sucrose/water solution at different cooling rates						
Cooling rate (°C·min ⁻¹)	<i>T</i> _c / °C	Δ <i>h</i> _c / J·g ⁻¹	<i>T</i> _e / °C	Δ <i>h</i> _e / J·g ⁻¹	<i>T</i> _d / °C	Δ <i>h</i> _d / J·g ⁻¹
1	-23.98	-167.66	-24.84	-13.52	—	—
3	-24.65	-166.65	-26.76	-6.90	-27.50	-0.66
5	-25.10	-168.01	-27.95	-2.56	-29.14	-3.94
10	-26.48	-168.60	—	—	-30.24	-7.12
20	-28.43	-169.21	—	—	-31.24	-7.41

heating rate: 10 °C·min⁻¹; *T*_c: crystallization temperature of water, *T*_e: eutectic temperature, *T*_d: devitrification temperature, Δ*h*_c: heat of crystallization of water, Δ*h*_e: heat of eutectic, Δ*h*_d: heat of devitrification

低, 在 DSC 常用的降温速率下, 也可能不会完全析出. 此时若要完全结晶, 则需进行退火处理.

2.2 退火温度对叔丁醇/蔗糖/水溶液冻结特性影响

针对 10%叔丁醇/10%蔗糖/水溶液, 在升温过程中选取不同的温度退火, 来观察*T*_g'和反玻璃化峰的变化.

从表 2 可以看出, 在-37 °C(刚刚出现反玻璃化)、-32 °C(反玻璃化峰下降沿的中点)、-30 °C(反玻璃化峰峰温)、-25 °C(反玻璃化刚刚结束)分别退火 20 min 后, *T*_g'均会升到-34.9 °C, 同时反玻璃化峰消失, 表明在反玻璃化峰附近的各个温度退火没有太大区别. *T*_g'最终回升到-34.9 °C, 而不是蔗糖/水溶液对应的-32.5 °C, 即使退火时间延长到 1 h 后仍是如此, 其原因可能是少量叔丁醇与蔗糖结合, 无法析出. 另外, 在-40 °C(玻璃化转变刚刚完成) 退火 20 min 后, *T*_g'升高到-37.4 °C, 但仍有微弱的反玻璃化峰, 表明退火温度接近*T*_g'时, 虽然仍可以强化结晶, 但由于溶液粘度较大, 使结晶速率减慢, 短时间内结晶不充分.

2.3 退火时间对叔丁醇/蔗糖/水溶液冻结特性影响

结晶是动力学过程, 在已有晶核的情况下, 晶体生长速率与温度有关, 温度过高或过低都不利于晶体生长. 因为温度过低, 一方面质点动能降低, 互相吸引力相对增大, 容易聚集和吸附到晶核表面, 这有利于晶体生长; 但另一方面, 温度过低将引起溶液粘度增大, 使质点移动困难, 难以从溶液扩散到晶核表面, 不利于晶体生长. 只有在某一特定的温度下, 生长速率才能达到最大值^[12].

研究了 10%叔丁醇/10%蔗糖/水溶液在不同的温度, 等温退火不同的时间所发生的现象. 发现以 10 °C·min⁻¹ 升温时, 冻结溶液升温到-25 °C后, 不等温而是马上降温到-80 °C, 待热流平衡后升温, *T*_g'也会上升到-34.9 °C左右, 反玻璃化峰消失. 若升温到-32 °C马上降温, 其它条件相同, 则*T*_g'上升到-37 °C, 仍有微弱的反玻璃化峰. 而在-40 °C, 即使退火

时间延长到 30 min, 仍有微弱的反玻璃化峰, *T*_g'为-37 °C, 低于-34.9 °C. 这表明退火时间严重依赖于退火温度. 当退火温度接近于*T*_g'时, 由于粘度大, 结晶阻力相应增大, 结晶速率慢, 达到完全结晶所需要的时间长. 从图 3 中可以清楚地看到反玻璃化峰随退火时间的变化过程. 随着退火时间增加, 退火后的 DSC 热流曲线反玻璃化峰逐渐减小, *T*_g'逐渐升高, 最后稳定在-34.9 °C左右. 根据上述实验情况分析, 在-25~-40 °C的温度区间内, 粘度对叔丁醇晶体生长起主要作用, 退火温度升高时, 溶液粘度降低, 晶体生长速率增大, 退火时间缩短. 而在某一特定的退火温度, 等温时间越长, 结晶越充分直至完全结晶.

冷冻干燥是一个高能耗的过程, 在达到退火效果的前提下, 退火时间越短越好, 因此理论上应该在较高的温度下退火. 但这要受到很多限制, 根据文献[12], 在更高的温度时, 分子的活动性更大, 在这种条件下, 小晶体由于具有很高的表面能, 在热力学上是不稳定的, 尤其是快速冷却过程中形成的小冰晶, 在加热时会发生再结晶, 小冰晶之间相互结合形成大冰晶, 使其表面积与体积之比达到最小. 而大冰晶使冻干品外观不好, 复水性差. 另外, 退火时间长短还与结晶成分本身的性质有密切关系, 本文中叔丁醇/蔗糖/水溶液在反玻璃化峰附近退火 20 min 即可消除反玻璃化峰, 而文献[10]中乙二醇/水溶液只需

表 2 退火温度对 10%叔丁醇/10%蔗糖/水溶液的 *T*_g'和反玻璃化峰的影响

Table 2 The effect of annealing temperature on *T*_g' and devitrification peak of 10%TBA/10%sucrose/water solution

Annealing temperature (°C)	<i>T</i> _g ' / °C	Devitrification peak
without annealing	-42.0	-30 °C, distinct
-25	-34.9	Not detected
-30	-34.9	Not detected
-32	-34.9	Not detected
-37	-34.9	Not detected
-40	-37.4	-30 °C, weak

annealing time: 20 min; cooling rate: 10 °C·min⁻¹; heating rate: 10 °C·min⁻¹

图3 10%叔丁醇/10%蔗糖/水溶液退火不同时间后的 DSC 曲线

Fig.3 The effect of annealing time on the DSC heating thermogram of 10%TBA/10% sucrose/water solution

cooling rate: $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$; heating rate: $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$;
annealing temperature: $-37\text{ }^{\circ}\text{C}$; annealing time:

1) unannealed, 2) 1 min, 3) 15 min, 4) 20 min, 5) 60 min

要 5 min. 因此, 在实际冻干中, 应该针对具体的冻干配方, 综合考虑退火对反玻璃化进而对最终冻干制品质量的影响来确定最佳的退火温度和时间。

3 结 论

冻干过程中是否需要退火处理与溶液的组成密切相关. 10%叔丁醇/10%蔗糖/水溶液在降温时, 蔗糖的存在严重阻碍了叔丁醇的结晶, 部分叔丁醇进入蔗糖玻璃体中, 玻璃化转变温度 T_g' 由 $-32.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 降

低到 $-42.0\text{ }^{\circ}\text{C}$, 升温时叔丁醇在 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 发生反玻璃化. 在反玻璃化峰附近的温度下进行退火处理都可以强化结晶, T_g' 由 $-42.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 上升到 $-34.9\text{ }^{\circ}\text{C}$, 同时反玻璃化峰消失. 消除反玻璃化所需的退火时间与退火温度有关, 当退火温度接近 T_g' 时, 由于溶液粘度增大, 所需的退火时间增加. 在 $-37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, 退火 20 min 可完全消除反玻璃化.

References

- 1 Rey, L.; May, J.C. Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products. New York: Marcel Dekker Inc., 2004: 2
- 2 Xiao, H.H.; Hua, Z.Z. *CryoLetters*, **2004**, *25*: 111
- 3 Kasraian, K.; Deluca, P.P. *Pharm. Res.*, **1995**, *12*: 484
- 4 Kasraian, K.; Deluca, P.P. *Pharm. Res.*, **1995**, *12*: 491
- 5 Wittaya-arekul, S.; Nail, S.L. *J. Pharm. Sci.*, **1998**, *87*: 491
- 6 Wittaya-arekul, S.; Nail, S.L. *J. Pharm. Sci.*, **2002**, *91*: 1147
- 7 van Drooge, D.J.; Hinrichs, W.L.J.; Frijlink, H.W. *J. Pharm. Sci.*, **2004**, *93*: 713
- 8 Searles, J.A.; Carpenter, J.F.; Randolph, T.W. *J. Pharm. Sci.*, **2001**, *90*: 872
- 9 Milton, N.; Nail, S.L.; Akers, M.J. *CryoLetters*, **1997**, *18*: 335
- 10 Gao, C.; Zhou, G.Y.; Xu, Y.; Hua, Z.Z. *Acta Phys.-Chim. Sin.*, **2004**, *20*(7): 701 [高 才, 周国燕, 胥 义, 华泽钊. 物理化学学报(*Wuli Huaxue Xuebao*), **2004**, *20*(7): 701]
- 11 Zuo, J.G.; Hua, Z.Z.; Liu, B.L.; Zhou, G.Y. *Cryogenics*, **2005**, (3): 48 [左建国, 华泽钊, 刘宝林, 周国燕. 低温工程(*Diwen Gongcheng*), **2005**, (3): 48]
- 12 Hua, Z.Z.; Ren, H.S. *Cryobiology and cryomedicine technology*. Beijing: Science Press, 1994: 80, 109 [华泽钊, 任禾盛. 低温生物医学技术. 北京: 科学出版社, 1994: 80, 109]

Annealing Properties of Lyoprotectant Solution*

ZUO, Jian-Guo HUA, Ze-Zhao LIU, Bao-Lin ZHOU, Guo-Yan XU, Yi

(Institute of Cryomedicine and Food Freezing, Shanghai University of Science and Technology, Shanghai 200093)

Abstract In order to examine the annealing behaviors of aqueous solutions of 10% tertiary butyl alcohol (TBA) and 10% sucrose in freeze-drying, a differential scanning calorimeter (DSC) has been employed to study freezing properties, annealing temperature, and annealing time. The experimental results show that when the solution is cooled, the existence of sucrose hinders the crystallization of TBA and the value of T_g' decreases from $-32.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $-42.0\text{ }^{\circ}\text{C}$, and TBA devitrifies at $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ when the solution is heated. When annealed at different temperatures around the devitrification peak, TBA all can crystallize completely and the value of T_g' increases from $-42.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $-34.9\text{ }^{\circ}\text{C}$. Annealing time depends on annealing temperature. The closer the annealing temperature is to T_g' , the longer the annealing time is. The devitrification will disappear after annealing at $-37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 20 min.

Keywords: Freeze-drying, Tertiary butyl alcohol, Sucrose, Annealing, Differential scanning calorimetry, Glass transition, Devitrification

Received: March 18, 2005; Revised: April 25, 2005. Correspondent: HUA, Ze-Zhao (E-mail: tchua@sh163.net; Tel: 021-65685291).

* The Project Supported by NSFC (50376040, 50436030) and Shanghai Municipal Education Commission