

Un développement nouveau de la lyophilisation: La cryodessiccation des systèmes non aqueux

Par LOUIS REY

Faculté des Sciences de Dijon (France) et Nestlé Alimentana S.A., Vevey (Suisse)

Les applications de la technique de lyophilisation à la conservation des produits biologiques ou alimentaires sont bien connues. Elles dérivent toutes du caractère particulier de cette méthode: opérer une déshydratation totale, mais ménagée, par sublimation directe, généralement sous vide, de la glace d'un produit préalablement congelé.

Réservée ainsi jusqu'alors à la stabilisation de systèmes aqueux, la lyophilisation, dans son principe même, n'est cependant pas limitée au traitement de produits hydratés. Nous avons voulu montrer, dans des recherches récentes, que cette technique peut également s'étendre à tout un ensemble de systèmes préparés à partir de solvants non aqueux¹. La cryodessiccation devient ainsi une méthode générale du génie chimique et n'est plus restreinte à une simple opération de déshydratation. Il convient d'ailleurs de noter que le terme de dessiccation, tel que nous pourrions l'employer, n'est pas équivalent à celui de déshydratation.

I. Lyophilisation des solutions dans les solvants organiques

L'extraction et la purification de nombreux composés naturels et, entre autres, des lipides, nécessite l'emploi de solvants organiques. Les solutions obtenues sont souvent instables et doivent être conservées à basse température (phospholipides dans le benzène ou le chloroforme). De plus, l'isolement du corps dissous ne peut s'obtenir que par évaporation du solvant ce qui s'accompagne souvent de dénaturation partielle.

La lyophilisation permet d'éliminer ces difficultés et d'obtenir aisément un produit sec, finement poreux et parfaitement stable. De nombreuses expériences ont été réalisées dans ce domaine (DOUSSET² et REY³) à l'aide d'un appareillage spécialement conçu pour le travail à basse température (Figures 1 et 2).

Remarques générales. La solution congelée à -196°C à l'aide d'azote liquide est placée sous vide puis réchauffée progressivement. Lorsque la température est suffisante pour que la tension de vapeur du produit congelé atteigne 0,1 Torr environ, le chauffage est arrêté et le système maintenu à basse température con-

stante. Le solvant se sublime alors régulièrement et le front de dessiccation, en pénétrant dans la masse rigide, laisse derrière lui une substance poreuse non altérée. Lorsque les dernières traces congelées ont disparu, on élève la température jusqu'à $+20^{\circ}\text{C}$. Le produit, devenu stable, est alors placé sous une atmosphère de gaz inerte (azote, argon) et peut désormais être conservé sans altérations à la température ambiante. L'opération de dessiccation s'étant effectuée à partir de l'état solide, la structure de l'échantillon n'est pas modifiée. Il possède ainsi les propriétés générales des produits lyophilisés: maintien des caractéristiques physico-chimiques et structurales, stabilité, porosité élevée et facilité de redissolution.

Quelques exemples de lyophilisations. Bien que dans son ensemble la lyophilisation des systèmes non aqueux soit très semblable à celle des solutions dans l'eau, tous les solvants organiques ne se prêtent pas à cette opération et seuls ceux qui possèdent une tension de vapeur élevée à l'état congelé peuvent se sublimer aisément. Il est nécessaire, en plus, que leur température de fusion soit suffisamment éloignée de leur température de sublimation pour qu'il n'y ait pas de risque de fusion interstitielle. Dans chaque cas particulier, nous avons donc procédé à l'étude du comportement thermodynamique à basse température des solutions à traiter à l'aide des méthodes que nous avons décrites à propos de la lyophilisation classique^{4,5} dont, entre autres, l'analyse thermique différentielle. Enfin, dans le cas des solutions diluées, et comme pour les systèmes aqueux, nous avons dû faire appel à des substances «de charge» pour conférer au produit sec une rigidité suffisante. Le maltose, le polystyrène et le

¹ Brevets Air Liquide – REY (1964).

² M. DOUSSET, Thèse de Biophysique, Université de Dijon, France (1964).

³ L. REY, *Les orientations nouvelles de la lyophilisation dans Aspects théoriques et industriels de la lyophilisation* (Ed.: HERMANN, Paris 1964), p. 621.

⁴ L. REY, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **85**, 510 (1960).

⁵ L. REY, *Fundamental aspects of lyophilisation dans Aspects théoriques et industriels de la lyophilisation* (Ed.: HERMANN, Paris 1964), p. 23.

distéarate de glycol ont tenu là le rôle normalement réservé au glycolle, au lactose ou au dextran.

Nos recherches, dans ce domaine, étant à leur début, nous ne présenterons ici que quelques résultats expérimentaux (Tableau I).

A titre d'exemple, nous indiquerons la possibilité de stabiliser des phospholipides animaux par lyophilisation à partir de leur solution benzénique et d'en assurer la conservation sans altération à la température ambiante (DOUSSET et CLEMENT⁶). La Figure 3 montre les courbes obtenues.

II. Lyophilisation des solutions dans l'ammoniac liquide

Conservation des radicaux libres. Ses remarquables propriétés font de l'ammoniac liquide un solvant exceptionnel et confèrent à son comportement beaucoup d'analogies avec celui de l'eau. Aisément congelables par l'azote liquide, ses solutions peuvent ensuite être lyophilisées par sublimation entre -130 et -110°C sous une pression voisine de $2 \cdot 10^{-2}$ Torr en présence d'un piège primaire à -196°C . La sublimation est

rapide (1 mm/h) et laisse un produit sec finement poreux et généralement très dur.

Cette opération peut présenter un grand intérêt à plusieurs titres: (a) L'ammoniac liquide est un solvant particulier et, de ce fait, on peut préparer à partir de ses solutions divers produits non solubles dans d'autres conditions. (b) L'ammoniac liquide est également un milieu réactionnel particulier où peuvent se former des espèces chimiques nouvelles, très souvent instables. La lyophilisation offre alors le moyen de les stabiliser et de les étudier. (c) L'ammoniac liquide agissant comme solvant permet de changer les conditions de lyophilisation de tissus imprégnés par du glycerol. On sait, en effet, que ce dernier ne s'élimine pas par lyophilisation dans les conditions habituelles. Il se dissout par contre parfaitement à -75°C lorsque les fragments de tissus

⁶ M. DOUSSET et G. CLEMENT, Travaux des Laboratoires de Biologie Physico-Chimique et de Physiologie Générale, Faculté des Sciences de Dijon (1964), non publiés.

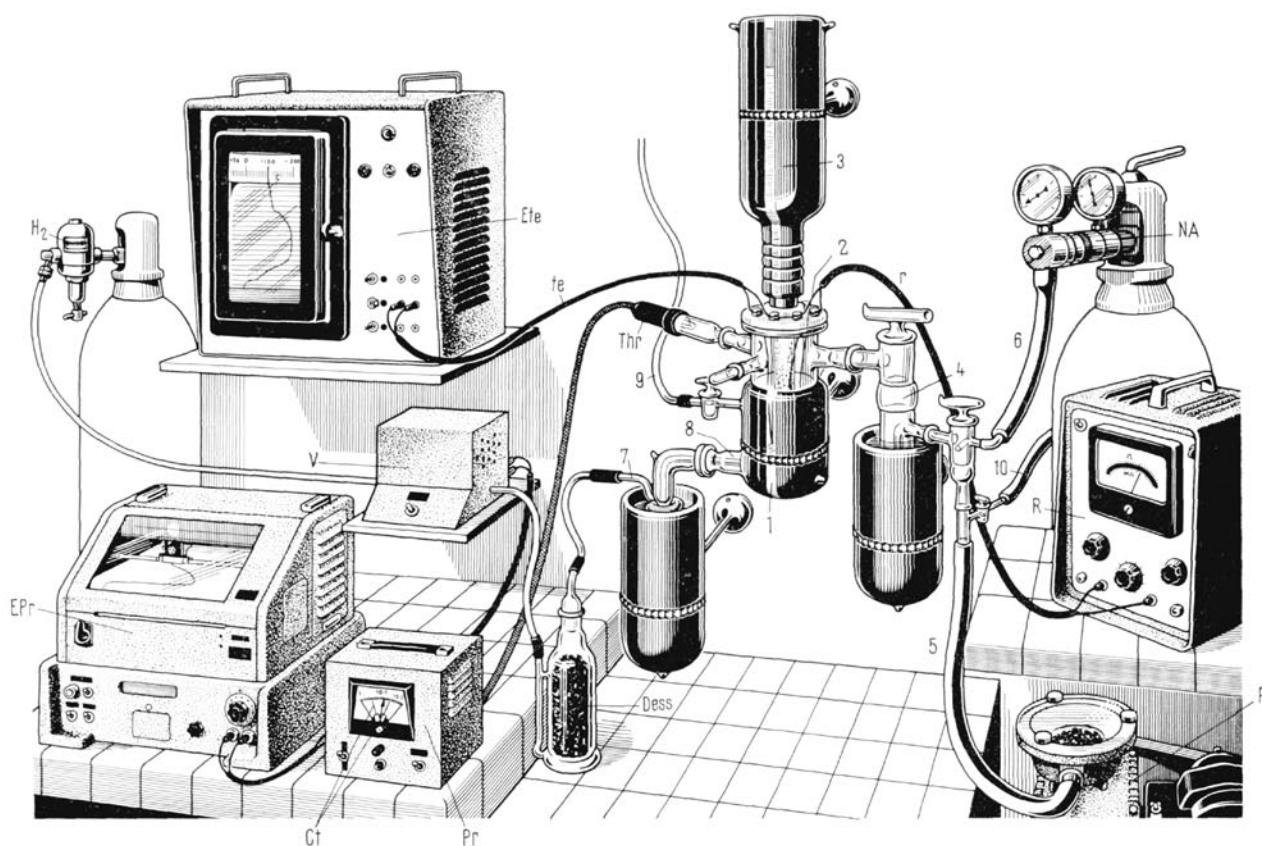


Fig. 1. Installation de Laboratoire pour lyophilisation contrôlée à basse température. Dessiccateur: 1, chambre de dessiccation; 2, pièce de liaison; 3, piège primaire; 4, piège secondaire; 5, ligne de pompage; P, pompe à vide (2 étages); 6, canalisation de rupture de vide par introduction de gaz neutre (NA); 10, élimination des vapeurs condensées (pompe à anneau liquide). Circuit de contrôle de la température de l'échantillon: H_2 , bouteille d'hydrogène; V, électrovanne commandée soit par la température (te) du produit, soit par sa pression de vapeur (Pr et Ct); Dess, desséchant; 7, arrivée de gaz à $+20^{\circ}\text{C}$; 8, sortie sous vide de gaz froid; 9, échappement. Contrôles et mesures: te, thermocouple; Ete, enregistreur de température; Thr, thermotron; EPr enregistrement de la pression; r, sondes de mesure de résistance électrique; R, résistivimètre.

Tableau I

Solvant	Température de fusion commençante des solutions, °C	Sublimation, °C			Pression au maximum de sublimation	Substance de charge : (si nécessaire = solutions diluées)
		début	intense	fin		
Benzène	+ 5	- 90	- 50	- 30	$2 \cdot 10^{-1}$ Torr	7,5% distéarate de glycol ou 0,1 à 1% polystyrène
Tétrachlorure de carbone	- 23	- 80	- 50	- 30	$1,5 \cdot 10^{-1}$ Torr	7,5% distéarate de glycol ou 0,1 à 1% polystyrène
Dioxane	+ 11	- 80	- 40	- 15	10^{-1} Torr	7,5% distéarate de glycol ou 0,1 à 1% polystyrène
Chloroforme	- 78	- 100	- 80		$2 \cdot 10^{-3}$ avec piège primaire	7,5% distéarate de glycol ou 0,1 à 1% polystyrène
Diéthylamine	- 63	- 110	- 70		$2 \cdot 10^{-3}$ avec piège primaire	5% maltose

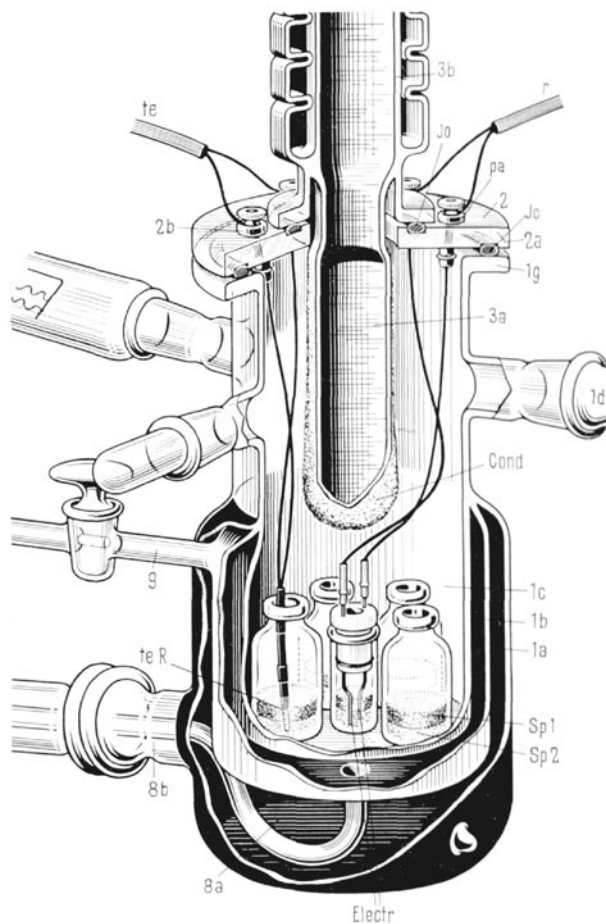


Fig. 2. Détails de construction du dessiccateur: 1a, jaquette de protection argentée sous vide; 1b, chemise de refroidissement; 1c, chambre recevant les produits en cours de lyophilisation (Sp1, poreux, Sp2, congelé); 1g, bride plane. 2a, pièce de liaison reposant sur des joints toriques (Jo) en silastic; 2b, passages étanches pour les mesures de température (te, teR) et de résistance électrique (r, Electr.). 3a, surface refroidie par l'azote liquide à -196°C servant à la condensation des vapeurs (Cond); 3b, Extrémité inférieure du vase Dewar contenant la réserve d'azote liquide pourvue d'anneaux de dilatation.

congelés sont immergés dans l'ammoniac liquide. La glace est extraite en même temps. Il suffit alors de congeler l'ammoniac de substitution grâce à l'azote liquide puis de lyophiliser ensuite le tissu imprégné d'ammoniac solide pour obtenir un fragment sec et stable. (d) L'ammoniac permet enfin de réaliser des lyophilisations à très basse température et cela permet d'envisager le stockage d'éléments à haute instabilité mais à forte réactivité chimique comme les radicaux libres. Il s'agit là, en fait, d'une méthode générale dont nous donnerons successivement le principe et un exemple d'application.

*Nouveau procédé de préparation et de stabilisation des radicaux libres*¹. Le système précurseur, de préférence liquide, où l'on désire préparer des radicaux libres, est préalablement refroidi et congelé à très basse température de façon à lui conférer la rigidité nécessaire. Il est alors activé à l'aide d'une méthode classique, par

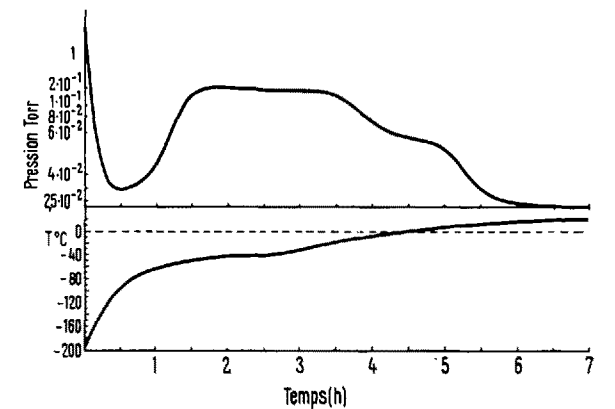


Fig. 3. Lyophilisation d'une solution de phospholipides à 0,5% dans le benzène sur support de polystyrène à 0,1%.

exemple par irradiation, qui fait apparaître une quantité élevée de radicaux libres.

On procède ensuite, éventuellement, à un réchauffement ménagé du système excité sans toutefois dépasser la température à laquelle risque de se produire une désactivation spontanée par migration radicalaire, puis on entreprend sa dessiccation. Celle-ci s'opère par lyophilisation, c'est-à-dire essentiellement par sublimation des molécules du ou des solvants congelés, cette cryodessiccation étant effectuée de préférence sous vide élevé.

On réalise ainsi une dessiccation poussée à basse température jusqu'à obtention d'un système sec, fortement chargé en radicaux libres devenus stables et qui peut alors être réchauffé jusqu'à la température ambiante où on le conservera soit sous vide, soit sous l'atmosphère protectrice d'un gaz neutre et sec (azote, argon...).

L'originalité du procédé consiste dans le fait que les radicaux libres se trouvent stabilisés par la combinaison de deux phénomènes:

Les radicaux formés par irradiation au sein de la solution congelée et maintenus immobiles par la basse température se trouvent successivement isolés, et de la sorte immobilisés dans leur site même de formation par la progression du front de dessiccation vers l'intérieur de la masse rigide. En fin d'opération, par suite de l'absence de milieu réactionnel entre eux, ils ne peuvent plus se recombinaison et demeurent donc à l'état radicalaire.

Ceux des radicaux qui sont formés lors de la période d'activation dans les veines de solvant congelé et qui risquent d'être entraînés lors du processus de sublimation sont fixés par adsorption sur l'énorme surface interne que représente le produit sec périphérique. En effet, la dessiccation s'opérant à partir de la surface libre externe du système congelé, une couche d'épaisseur croissante de produit sec se forme au fur et à mesure que le front de dessiccation s'enfonce vers la partie centrale de l'échantillon. Elle exerce une action filtrante sur les vapeurs émises par l'échantillon lui-même qui se comporte comme un système auto-absorbant. Cette rétention supplémentaire de radicaux libres vient accroître l'effet précédent et contribue à maintenir le caractère «actif» du système initial.

Le procédé que nous proposons là combine donc les avantages de la stabilisation par les basses températures, ceux de la dessiccation et ceux qu'apporte la technique d'adsorption sur filtres actifs.

Exemple: En utilisant comme système expérimental une solution de *l*-lysine à 10% activée par irradiation γ à -196°C , on met en évidence l'intérêt d'une lyophilisation conduite à très basse température sur la conservation des radicaux libres. Le Tableau II montre les résultats de l'analyse effectuée à $+20^\circ\text{C}$ par résonance paramagnétique électronique (appareil micro-

spin Hilger and Watts – bande X) sur des échantillons conservés 8 jours à l'état sec.

Ce résultat s'interprète aisément en considérant les courbes de thermoluminescence des deux systèmes irradiés où apparaît une désactivation spontanée entre -172 et -94°C .

III. Lyophilisation des solutions dans l'anhydride carbonique liquide

De même que l'ammoniac, l'anhydride carbonique peut être utilisé comme solvant. Ses caractéristiques physiques très spéciales lui confèrent d'ailleurs, dans ce cas précis, de remarquables propriétés que nous avons voulu étudier en étroite collaboration avec le Centre d'Etudes Cryogéniques de l'Air Liquide⁷.

Préparation des solutions. La dissolution de composés ou l'extraction de systèmes par l'anhydride carbonique liquide se font sous pression et à basse température. Nous avons réalisé dans ce but un appareillage spécial (Figures 4 et 5) éprouvé à 75 kg/cm^2 où le gaz liquéfié peut être admis à la température de -35°C , sous 12 kg de pression, dans un récipient cylindrique contenant la substance à dissoudre ou à extraire. La mise en solution se fait avec agitation continue et sous contrôle visuel.

Lyophilisation – Congélation. Lorsque la solution est prête, on peut en effectuer la congélation de deux façons différentes: (a) Par détente de l'atmosphère interne de l'appareil, la température s'abaisse jusqu'au point triple ($-56,6^\circ\text{C} = 5,2\text{ kg}$ absolus) par suite de l'évaporation intense du liquide. Si la détente se poursuit, l'ensemble se congèle brutalement sous la forme d'une masse plus ou moins régulière qui atteint $-78,8^\circ\text{C}$ lorsque l'on rejoint la pression atmosphérique. Dans cette opération, on a perdu les $3/4$ du liquide avec les risques d'entraînement que cela com-

Tableau II

Système	Dose d'irradiation rayons γ	T° de lyophilisation °C	Intensité relative du signal RPE
<i>l</i> -lysine à 10% dans H_2O	0	-30	0
<i>l</i> -lysine à 10% dans H_2O	1.000.000 rads	-30	2.000
<i>l</i> -lysine à 10% dans NH_3	1.000.000 rads	-120 à -110	6.000.000

⁷ A Sassenage (Isère, France).

porte et obtenu une structure spumeuse peu propice à de bons transferts de chaleur. (b) Dans la deuxième technique, on refroidit la solution par circulation d'azote liquide dans le serpentin situé sous le récipient qui la contient. La pression s'abaissant au fur et à mesure que la température décroît, on maintient une pression constante égale à 10 kg grâce à une arrivée d'azote. De la sorte, on peut congeler régulièrement le liquide en une plaque homogène sans variation importante de volume. Vers -110°C , on effectue la remise à la pression atmosphérique par détente de l'azote.

Lyophilisation - Sublimation. La sublimation de l'anhydride carbonique solide s'effectue spontanément à $-78,8^{\circ}\text{C}$ et à la pression atmosphérique. Il suffit donc d'atteindre cette température pour que la dessiccation commence. On pourra alors en régler la vitesse en dosant l'apport de chaleur dans la spirale située sous le produit congelé, tout en maintenant la température constante et égale à $-78,8^{\circ}\text{C}$. On réalise ainsi automatiquement une *lyophilisation à basse température*.

ture, à la pression atmosphérique et qui peut être à vitesse élevée.

La Figure 6 en donne un exemple dans le cas d'une solution de camphre à 20% dans le CO_2 liquide. Comme l'indiquent les diverses courbes, l'opération est très rapide et dans sa phase initiale on note des vitesses de migration du front de sublimation allant jusqu'à 15 mm/h. Ceci est dû à l'excellent transfert de chaleur au travers de la masse rigide. L'enfoncement de l'interface de dessiccation des deux côtés de la plaque, rend ensuite le passage des calories plus difficile, ce qui explique le ralentissement de son évolution (de 3 à 8 mm/h).

En fin d'opération, on trouve un produit parfaitement sec et qui présente toutes les caractéristiques d'une substance bien lyophilisée.

De nombreuses applications de cette méthode sont à l'étude dans notre laboratoire.

Conclusions

Nous pensons que ce dernier exemple montre combien on peut attendre de l'extension du procédé de lyophilisation aux solvants non aqueux. On dispose là, en effet, d'une méthode originale permettant la préparation rapide de substances instables à haute activité et, le plus souvent, par traitement à très basse température. La Chimie, comme la Biologie et les Industries Alimentaires y feront sans doute largement appel.

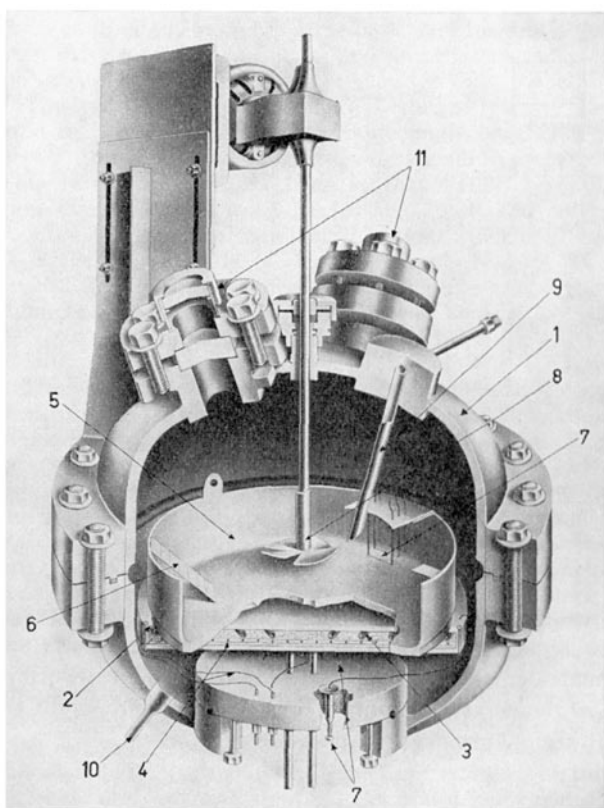


Fig. 4. Appareillage utilisé pour les lyophilisations dans l'anhydride carbonique. 1, enceinte étanche résistante à la pression; 2, plateau support permettant soit la congélation par circulation d'azote liquide (3), soit le chauffage par résistance électrique (4); 5, récipient servant à la lyophilisation; 6, niveau à lecture directe; 7, couples thermoélectriques étagés; 8, agitateur mobile; 9, canalisation d'arrivée du CO_2 liquide; 10, canalisation d'azote gazeux; 11, Hublots d'observation.

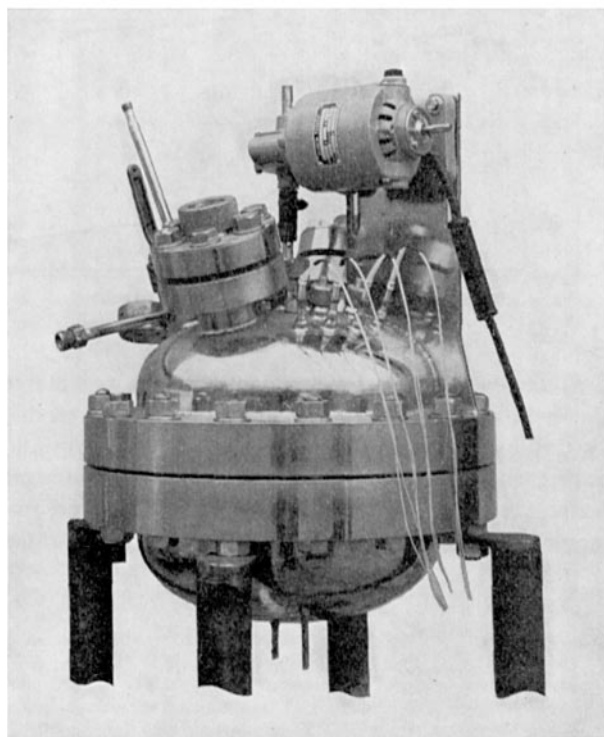


Fig. 5

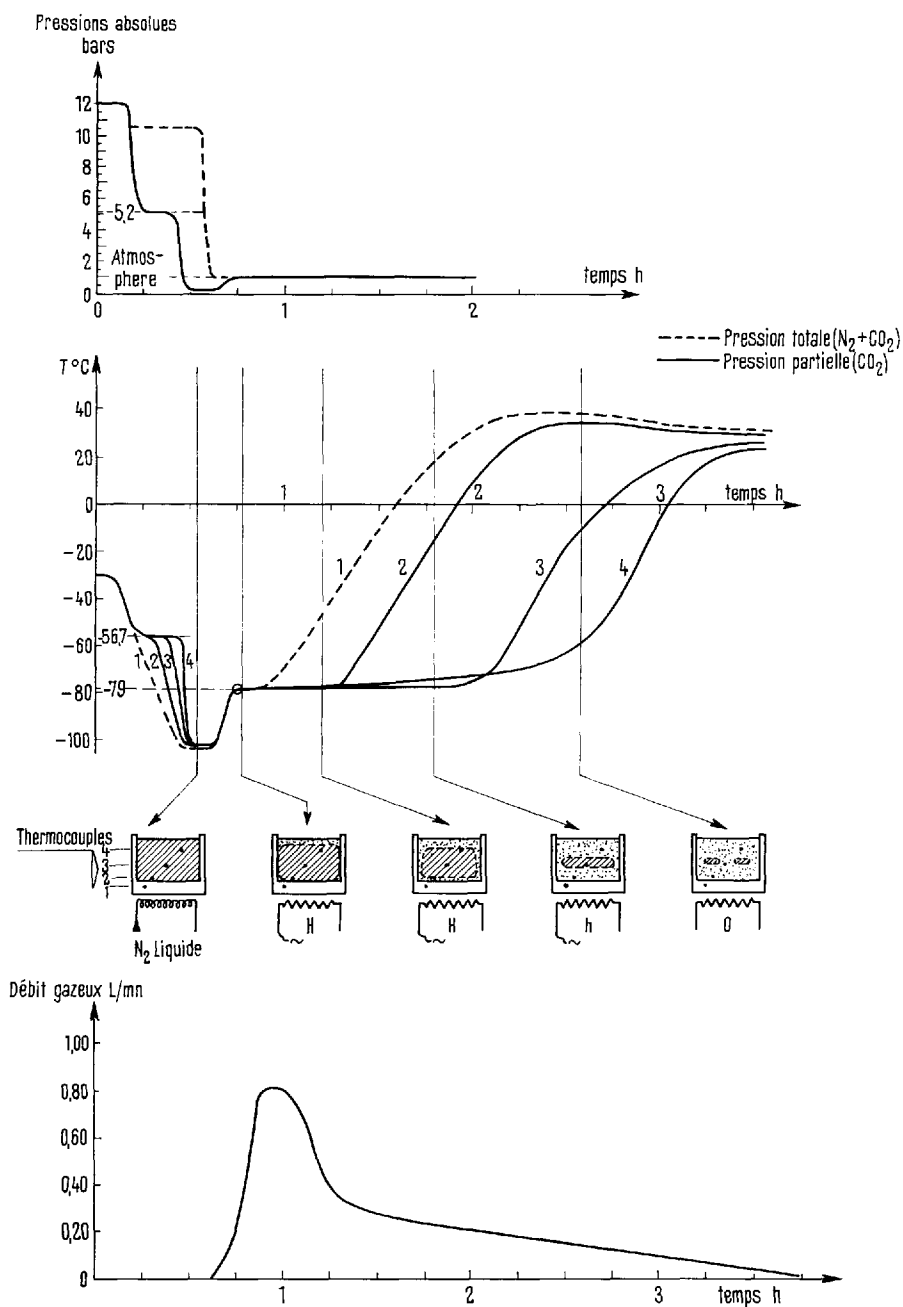


Fig. 6. Analyse des différentes phases de la lyophilisation d'une solution de camphre à 20 % dans l'anhydride carbonique.

Summary. A new development is made to enlarge the field of lyophilization using non-aqueous media. Unstable compounds are preserved by freezing and drying their solutions in organic solvents. The same technique applied to chemicals dissolved in liquid ammonia enables the preparation of stable concentrated

free radicals, due to the very low temperature of sublimation of frozen NH_3 . Finally, experiments are made demonstrating the possibilities of high velocity, low temperature sublimation of solutions in solid CO_2 at normal atmospheric pressure.