

分类号: R457
学号: 20232106021

密级:
单位代码: 10759

石河子大学

硕士学位论文



血浆冻干制剂的保护剂筛选及其对血管内皮损伤修复作用初步研究

学位申请人	周明珠
指导教师	胡圣伟 教授 马玉媛 副研究员
申请学位类别	专业硕士
专业名称	生物与医药
研究领域	生物技术与工程
所在学院	生命科学学院

中国·新疆·石河子

2026年5月

分类号: R457
学号: 20232106021

密级:
单位代码: 10759

石河子大学

硕士学位论文



血浆冻干制剂的保护剂筛选及其对血管内皮损伤修复作用初步研究

学位申请人	周明珠
指导教师	胡圣伟 教授 马玉媛 副研究员
申请学位类别	专业硕士
专业名称	生物与医药
研究领域	生物技术与工程
所在学院	生命科学学院

中国·新疆·石河子
2026年5月

Protectant Screening for Freeze-Dried Plasma and Its Protective Effects against Vascular Endothelial Injury

A Dissertation Submitted to
Shihezi University
In Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of
Professional Master 's Degree

By

Zhou Mingzhu
(**Biochemistry and Molecular Biology**)

Dissertation Supervisor:
Prof. Hu-shengwei
Associate Researcher Ma Yuyuan

May, 2026

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：周朋环

时间：2026年5月18日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：周朋环

时间：2026年5月18日

导师签名：



时间：2026年5月18日

摘要

目的: 冻干血浆 (FDP) 具有便携性好、可快速复溶使用等优势, 在特殊环境和院前急救等场景中可替代新鲜冰冻血浆 (FFP) 使用, 目前国内仍在研发阶段且尚无冻干血浆产品出售。冻干血浆冷冻干燥过程及其后续储存均可能导致蛋白质的不稳定。本研究系统筛选适用于血浆冻干的保护剂, 并探索保护剂对人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 损伤的修复作用, 初步探究其分子机制, 为冻干血浆的研发和临床应用提供实验参考。

方法: 以新鲜冰冻血浆为原料, 选择甘氨酸、海藻糖、甘露醇及右旋糖酐、羟乙基淀粉、羟丙基- β -环糊精共四大类 6 种保护剂, 考察其对血浆冻干前后及冻干后温度 $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60\%\pm 5\%$ 贮存 0 天、3 天、7 天、10 天期间凝血功能、蛋白氧化程度及微粒聚集状态的影响。除此之外, 比较保护剂对新鲜冰冻血浆关键冻干参数影响。基于人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 损伤模型, 通过转录组测序分析保护剂对细胞基因表达谱的影响, 采用 GO 和 KEGG 富集分析初步考察其保护机制。

结果: (1) 保护剂在冻干前后对血浆凝血功能、微粒聚集状态及蛋白氧化程度无显著影响 ($P>0.05$)。海藻糖组塌陷温度高于甘氨酸组, 更利于优化冻干工艺; 两组血浆 T_g 无统计学差异 ($P>0.05$), 但海藻糖组 T_g 检测重现性更优 (2) 血浆冻干后于温度 $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60\%\pm 5\%$ 贮存 10 天后, 甘氨酸组凝血因子 V、VIII 活性回收率分别达 85.7% 和 100%, 高于对照组 (71.4% 和 80%), 并使 AP TT 和 PT 延长幅度分别减少 4s 和 1.3s。甘氨酸和右旋糖酐可显著延缓冻干后存储 10 天蛋白巯基氧化 ($P<0.05$), 但保护剂对蛋白质羰基氧化无显著影响 ($P>0.05$)。海藻糖组不溶性微粒数量存储 10 天期间维持在较低水平 ($2233\sim 5233$ particles/ mL), 在减轻微粒聚集方面表现较优。但保护剂在冻干后存储不同期对微粒聚集和浊度无显著影响 ($P>0.05$)。 (3) 与模型组相比, FDP 单用及其与甘氨酸、海藻糖联合应用均可显著降低细胞晚期凋亡率, 发挥抗凋亡保护作用; 而甘氨酸或海藻糖单独使用未表现出抗凋亡效应, 甚至可能促进细胞凋亡。

结论: 甘氨酸和海藻糖是血浆冻干的优选保护剂, 前者在维持凝血因子活性、减轻氧化损伤方面效果突出, 后者更利于减轻微粒聚集。FDP 单用及其与甘氨酸、海藻糖联合应用均可显著降低细胞早期及晚期凋亡率, 发挥抗凋亡保护作用。海藻糖和甘氨酸组差异富集基因具有抗凋亡、增强内皮连接、维持血管稳定性等作用, KEGG 通路提示紧密连接 (Tight junction) 通路上调从而促进缺氧/TNF- α 损伤后内皮细胞的代谢恢复与功能修复。本研究为冻干血浆的配方优化、工艺建立及临床应用提

供了实验依据。

关键词：冻干血浆；保护剂；凝血因子；氧化损伤；血管内皮细胞

Abstract

Objective: Freeze-dried plasma (FDP) has the advantages of good portability and rapid reconstitution, and can be used as an alternative to fresh frozen plasma (FFP) in special environments and pre-hospital first aid. Currently, it is still in the research and development stage in China, and no freeze-dried plasma product is available for sale. Both the freeze-drying process and subsequent storage may cause instability of plasma proteins. In this study, we systematically screened suitable lyoprotectants for plasma lyophilization, explored their repair effects on human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) injury, and preliminarily investigated the underlying molecular mechanisms, so as to provide experimental references for the development and clinical application of FDP.

Methods: Using fresh frozen plasma as the raw material, 6 kinds of lyoprotectants from 4 categories were selected, including glycine, trehalose, mannitol, and dextran, hydroxyethyl starch, hydroxypropyl- β -cyclodextrin. The effects of these protectants on coagulation function, protein oxidation, and microparticle aggregation were evaluated before and after lyophilization, as well as during storage at $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ and $60\%\pm 5\%\text{RH}$ for 0, 3, 7, and 10 days. In addition, compare the effects of lyoprotectants on key lyophilization parameters of FFP. Based on the injured HUVEC model, transcriptome sequencing was used to analyze the effects of lyoprotectants on cellular gene expression profiles, and GO and KEGG enrichment analyses were performed to preliminarily explore the protective mechanisms.

Results: (1) Lyoprotectants showed no significant effects on plasma coagulation function, microparticle aggregation, or protein oxidation before and after lyophilization ($P>0.05$). The collapse temperature of the trehalose group was higher than that of the glycine group, which was more conducive to the optimization of lyophilization process. There was no significant difference in T_g' between the two groups ($P>0.05$), but the trehalose group exhibited better repeatability in T_g' measurement. (2) After 10 days of storage at $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ and $60\%\pm 5\%\text{RH}$ following lyophilization, the recovery rates of coagulation factor V and VIII activities in the glycine group reached 85.7% and 100%, respectively, which were higher than those in the control group (71.4% and 80%). Glycine also reduced the prolongation of APTT and PT by 4 s and 1.3 s, respectively. Glycine and dextran significantly delayed the oxidation of protein sulfhydryl groups during 10-day storage after lyophilization ($P<0.05$), whereas lyoprotectants had no significant effect on protein carbonyl oxidation ($P>0.05$). The number of insoluble microparticles in the trehalose group remained at a low level (2233~5233 particles/mL) during 10-day storage, showing a superior effect in alleviating microparticle aggregation. However, lyoprotectants had no significant effects on microparticle aggregation and turbidity at different storage time points after lyophilization ($P>0.05$). (3) Compared with the model group, FDP alone and its combination with Gly or Tre significantly reduced late apoptotic rates, exerting anti-apoptotic effects; whereas Gly or Tre alone showed no protective effect and even promoted cell apoptosis.

Conclusion: Glycine and trehalose are the preferred lyoprotectants for freeze-dried plasma. Glycine shows outstanding effects in maintaining coagulation factor activities and alleviating oxidative damage, while trehalose is more conducive to reducing microparticle aggregation. Trehalose and glycine group differentially enriched genes exhibit effects such as anti-apoptosis, enhancement of endothelial junctions, and maintenance of vascular stability. KEGG pathway analysis indicates that the upreg

ulation of the tight junction pathway promotes metabolic recovery and functional repair of endothelial cells following hypoxia/TNF- α -induced injury. This study provides an experimental basis for formula optimization, process establishment, and clinical application of freeze-dried plasma.

Key words: Freeze-dried plasma; lyoprotectant; coagulation factor; oxidative injury; vascular endothelial cell

目录

第 1 章 文献综述.....	1
1.1 血浆冻干制剂概述.....	1
1.2 已上市冻干血浆产品.....	1
1.3 冷冻干燥和冻干后存储对血浆质量的影响.....	2
1.3.1 冷冻干燥对血浆质量的影响.....	2
1.3.2 冷冻干燥后存储对血浆质量的影响.....	3
1.4 冻干保护剂介绍.....	3
1.4.1 糖类冻干保护剂.....	3
1.4.2 氨基酸类冻干保护剂.....	4
1.4.3 多元醇类冻干保护剂.....	4
1.4.4 高分子类冻干保护剂.....	4
1.4.5 表面活性剂类冻干保护剂.....	5
1.4.6 蛋白类冻干保护剂.....	5
1.5 血浆对血管内皮修复作用相关研究.....	5
1.5.1 血管内皮的屏障与调节功能.....	5
1.5.2 血管内皮损伤的病理机制.....	6
1.5.3 血浆成分及其内皮保护作用.....	6
1.5.4 冻干血浆的内皮保护研究进展.....	7
1.5.5 血浆保护剂与内皮损伤修复.....	7
1.6 本课题的研究目的、内容与意义.....	8
1.7 技术路线.....	9
第 2 章 保护剂对冻干前后血浆质量的影响.....	10
2.1 实验材料.....	10
2.1.1 血浆样品.....	10
2.1.2 主要试剂.....	11
2.1.3 主要仪器.....	12
2.2 实验方法.....	13
2.2.1 样品制备.....	13
2.2.2 样品重构.....	13
2.2.3 外观检测.....	13

2.2.4	水分含量检测	14
2.2.5	凝血参数检测	14
2.2.6	蛋白氧化程度检测	14
2.2.7	微粒聚集程度检测	14
2.2.8	玻璃化转变温度检测	14
2.2.9	塌陷温度检测	15
2.2.10	液体玻璃化转变温度检测	15
2.2.11	数据统计与分析	15
2.3	结果与分析	15
2.3.1	保护剂对血浆冻干前后外观的影响	15
2.3.2	保护剂对血浆冻干前后水分含量的影响	16
2.3.3	保护剂对血浆冻干前后凝血参数的影响	17
2.3.4	保护剂对血浆冻干前后氧化程度的影响	18
2.3.5	保护剂对血浆冻干前后微粒聚集程度的影响	19
2.3.6	保护剂对血浆冻干前后玻璃化转变温度的影响	20
2.3.7	保护剂对新鲜冰冻血浆塌陷温度的影响	21
2.3.8	保护剂对新鲜冰冻血浆玻璃化转变温度的影响	22
2.4	讨论	23
2.5	小结	24
第3章	保护剂对血浆冻干后不同存储期血浆质量的影响	26
3.1	实验材料	26
3.1.1	血浆样品	26
3.1.2	主要试剂	26
3.1.3	主要仪器	28
3.2	实验方法	29
3.2.1	样品制备	29
3.2.2	样品重构	29
3.2.3	外观检测	29
3.2.4	酸碱度检测	30
3.2.5	凝血参数检测	30
3.2.6	蛋白氧化程度检测	30
3.2.7	微粒聚集程度检测	30
3.2.8	数据统计与分析	30
3.3	结果与分析	31

3.3.1	保护剂对血浆冻干后不同存储期外观的影响	31
3.3.2	保护剂对血浆冻干后不同存储期酸碱度的影响	31
3.3.3	保护剂对血浆冻干后不同存储期凝血参数的影响	32
3.3.4	保护剂对血浆冻干后不同存储期氧化程度的影响	34
3.3.5	保护剂对血浆冻干后不同存储期微粒聚集程度的影响	34
3.4	讨论	35
3.5	小结	36
第 4 章	保护剂对血管内皮细胞损伤修复作用的转录组分析	37
4.1	实验材料	37
4.1.1	血浆样品	37
4.1.2	实验细胞	37
4.1.3	主要试剂	37
4.1.4	主要仪器	38
4.2	实验方法	39
4.2.1	工作液配制	39
4.2.2	细胞培养与细胞损伤模型建立	39
4.2.3	细胞 RNA 提取及文库构建	42
4.2.4	转录组原始数据处理	42
4.2.5	基因及表达量分析	42
4.2.6	表达量差异分析	42
4.2.7	差异基因统计分析	43
4.2.8	差异基因 GO 分类分析	43
4.2.9	差异基因 KEGG 分析	43
4.3	结果与分析	44
4.3.1	保护剂对细胞凋亡情况的影响	44
4.3.2	数据质量控制	45
4.3.3	组间差异表达基因统计	46
4.3.4	差异基因 GO 富集分析	48
4.3.5	差异基因 KEGG 通路分析	49
4.4	讨论	51
4.5	小结	53
第 5 章	创新点与展望	54
5.1	创新点	54
5.2	展望	54

参考文献	55
致谢	65
作者简介	66

第 1 章 文献综述

1.1 血浆冻干制剂概述

出血是造成伤员可预防性死亡的首要原因，对于失血过多的重伤患者，院前输血救治对于挽救伤员性命、降低死亡率、修复受损的血管内皮至关重要^[1-3]。因此，用于院前早期给药的血液制品尤为重要。新鲜冰冻血浆（FFP）指由抗凝全血于 6-8 小时内低温离心、分离出血浆并速冻成固态的成分血，其内含所有种类的凝血因子，是用于输血治疗的重要血液制品。新鲜冰冻血浆需要低温环境冷冻保存，临床输注前需经专用加温装置解冻处理，并且所需时间长^[4]。然而，在战场或偏远地区等恶劣条件下，冷冻与解冻设备不足，难以满足创伤患者对血浆的即时需求，从而限制了新鲜冰冻血浆的使用，可能导致治疗延误^[5,6]。相较于 FFP，冻干血浆（FDP）具有明显的应用便捷性：冻干血浆可在常温条件下进行储存与运输，不需要庞大的低温冷链设备，减轻血液保障压力。同时，冻干血浆仅需数分钟即可复溶，更适用于复杂环境下的院前血液保障^[7]。此外，院前输注冻干血浆也可以减少新鲜冰冻血浆在运输和解冻过程中，袋子破损造成的损失^[8]。因此综上所述，冻干血浆在院前急救中的便捷性与实用性，使其成为弥补传统新鲜冰冻血浆应用局限的重要解决方案。

1.2 已上市冻干血浆产品

早期由于技术的局限性，冻干血浆制备过程中缺乏病毒安全性保障措施，存在较大的病毒传播风险，因此在 20 世纪 60 年代至 90 年代各国相继停止了冻干血浆的生产和使用^[9-11]。20 世纪 90 年代初，随着病原体减少技术的发展以及筛选方法的改进，冻干血浆的安全性得到显著提高。目前国外已上市 4 款冻干血浆产品，包括德国红十字会研制的单供体冻干血浆 LyoPlas N-w、法国军事血液研究所研制的 ABO 通用型冻干血浆 FLYP、南非国家生物制品研究所研制的 Bioplasma FDP、以及瑞典 Octapharma AB 公司研制的 OctaPlasLG Lyo。

法国自 1994 年起生产 FLYP，FLYP 是由采集自最多 11 位献浆者的单采血浆混合后制备而成^[12]。通过混合 A 型、B 型、AB 型三种不同血型血浆使抗 A、抗 B 血凝素滴度降低，从而使其适用于各血型患者。通过排除 HLA 抗体阳性的有妊娠史妇女血浆降低输血相关肺损伤发生风险，采用补骨脂素光化学法作为病原体灭活方法以提高产品安全性。法国血液预警系统自 1994 年以来持续监测 FLYP，迄今为止未报告任何不良反应或传染性并发症。2011 年，FLYP 获得法国保健品卫生安全局 (AFSSAPS) 授权，可用于

环境恶劣的平民或在获得解冻血浆之前使用^[13]。2018 年, FLyP 获得美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准, 允许美国军方有限度紧急授权使用^[14]。

上世纪九十年代初, 德国红十字会开发了 S/D 病毒灭活混合冻干血浆, 至 2006 年使用了超过 300000 单位的产品。2007 年后改为生产单供体冻干血浆 LyoPlas N-w, 以避免大量血浆混合导致的潜在朊病毒传染风险^[15]。LyoPlas N-w 为血型特异性, 使用时需同型输注, 未经过病毒灭活。

南非国家生物制品研究所生产的 Bioplasma FDP 是经 S/D 病毒灭活的通用型冻干血浆, Bioplasma FDP 有 50 mL 和 200 mL 两种规格, 在 25℃ 条件下可保存 2 年, 使用无菌水可在 10 分钟内复溶。该产品为南非批准上市产品, 自 1996 年以来在南非及周边国家的普通人群中使用^[16]。南非血液管理共识指南指出, 该产品可替代新鲜冰冻血浆用于各种类型患者, 包括创伤或产后出血的大失血患者。

OctaPlasLG Lyo 是瑞典 Octapharma AB 公司基于其早期上市产品 OctaPlas LG (由 630-1520 单位混合血浆制备) 研发的 ABO 通用型 S/D 病毒灭活冻干血浆。2023 年, 经欧洲药品管理局批准 OctaPlasLG® 适用于包括院前急救和战创伤救治在内的紧急输血场景。2024 年, 瑞士 Octapharma 公司生产的冻干血浆粉末 octaPlasLG Powder 获得美国 FDA 紧急使用授权 (EUA), 允许美军在“血浆不可得或无法使用”的战创伤出血或凝血病情况下应急使用。

1.3 冷冻干燥和冻干后存储对血浆质量的影响

1.3.1 冷冻干燥对血浆质量的影响

冷冻干燥过程包括预冻、升华干燥和解吸干燥 3 个阶段, 整个冻干过程中存在许多不稳定因素, 包括①低温: 可能是蛋白质中疏溶剂相互作用的减少, 可以达到蛋白质稳定性为零的程度, 从而导致冷变性。②集中效应: 冻结蛋白质溶液会因结冰而迅速增加所有溶质的浓度。因此, 所有与浓度有关的物理性质都可能发生变化, 这些变化可能会潜在地破坏蛋白质的稳定性^[17]。③冰-水界面: 冷冻蛋白质溶液会产生冰水界面。蛋白质可以被吸附到界面上, 使蛋白质的天然折叠松动, 导致表面诱导变性。④pH 值: 许多蛋白质只在很小的 pH 值范围内稳定。在极端的 pH 值下, 蛋白质中带电基团之间静电斥力的增加往往会导致蛋白质展开或变性。冷冻缓冲蛋白溶液可以选择性地使一种缓冲物质结晶, 引起 pH 值变化^[18]。⑤冻结时相分离: 由于聚合物在低温下溶解度的改变, 冷冻聚合物溶液可能会导致相分离, 并产生大量过剩的界面, 使蛋白质变性。⑥脱水压力: 完全水合的蛋白质有一层单层水覆盖在蛋白质表面, 称为水合壳。冻干过程会剥离部分蛋白质的水合壳层。水合状态的蛋白质在脱水进程中, 因处于缺水环境, 往往会将

质子转移至电离的羧基基团,进而最大程度中和自身携带的电荷。电荷密度的降低可能会促进蛋白质-蛋白质之间的疏水相互作用,导致蛋白质聚集^[19]。⑦氧化:在冻干过程中,活性氧物质(ROS)如超氧阴离子自由基积累,这反过来又可能与生物分子(即脂质,蛋白质)反应,从而损害其功能和识别位点。

将蛋白质样品置于冷冻和/或干燥环境中可能会导致其化学和物理性质的剧烈变化^[20,21]。在降低温度和去除结合水的过程中,分子间的相互作用通常会发生变化,导致生物分子相和结构的变化以及聚集^[22]。此外,超氧阴离子自由基等活性氧物种(ROS)积累,进而可能与生物分子(如脂类、蛋白质、核酸)反应,从而损害它们的功能和识别位置^[23]。蛋白质的氧化损伤会导致蛋白质羰基的形成,对其含量的评估可以作为整体蛋白质氧化的标志^[24]。因此,血浆在冻干过程中加入保护剂对于血浆蛋白质的稳定性至关重要。

1.3.2 冷冻干燥后存储对血浆质量的影响

血浆是包含多种凝血因子的混合蛋白体系,温度、湿度、光照、辐射或氧化等微环境胁迫,均会导致蛋白变性、聚集或活性损失。因此,除优化干燥工艺外,必须引入冷冻干燥保护剂作为辅助手段。即使在冷冻干燥成功后,蛋白质的长期储存稳定性可能仍然非常有限,特别是在较高的储存温度下。在某些情况下,根据储存温度和配方组成的不同,蛋白质在固态时的稳定性与液态时相同,甚至更差。例如,人胰岛素样生长因子I(hIGF-I)的主要降解途径是Met59的氧化,冻干制剂中的氧化速率与25°C或30°C溶液中的氧化速率大致相同^[25];在40°C储存期间,冻干制剂中由葡萄糖诱导的Des-Ser松弛素生成速率快于溶液状态^[26]。这些例子表明,在冻干制剂中仍然需要稳定剂来增加长期储存稳定性。

1.4 冻干保护剂介绍

冷冻干燥保护剂的研究对冷冻干燥的发展尤为重要。蛋白质冷冻干燥保护剂包括为糖类、氨基酸类、多元醇类、高分子类、蛋白类等。如下,我们将对不同类别保护剂展开详细描述。

1.4.1 糖类冻干保护剂

糖类是应用最广泛的冷冻干燥保护剂^[27],对冷冻干燥过程中所产生的不稳定因素影响均有效^[28-31]。一般糖类冷冻干燥保护剂有海藻糖^[32]、乳糖^[33]、蔗糖^[34]、麦芽糖^[35]等,其中最常使用的是海藻糖^[36]。其作用机制主要包括:①“水替代假说”:糖类分子在干燥状态下与蛋白质极性基团形成氢键,替代失去的水分子,维持蛋白质构象。②“玻璃

化假说”：糖类在冻干制品中形成无定形玻璃态，包裹蛋白质分子，限制其分子运动，防止变性。葡萄糖是血浆固有成分，用于血浆采集的所有抗凝剂中都含有葡萄糖。然而，葡萄糖也是一种还原糖，它与蛋白质发生反应，并通过美拉德反应导致蛋白质糖化和失活。美拉德反应对蛋白质极其有害，尤其是冻干形式的蛋白质，其中存在反应物终浓度增加的条件。因此，葡萄糖或其他还原糖在冻干蛋白质制剂中被认为是有问题的^[37]。冻干状态下的葡萄糖对血浆蛋白的糖化可能被认为是导致凝血因子活性降低的主要因素^[38]。一般来说，蔗糖和海藻糖这两种二糖是冻干制剂中最常用的蛋白质稳定剂。它们的保护特性有据可查，包括它们保护凝血因子蛋白和纤维蛋白原的能力。

1.4.2 氨基酸类冻干保护剂

氨基酸可通过“优先排阻机制”发挥保护作用，即氨基酸优先与溶剂水分子相互作用，促使蛋白质分子优先水合，从而稳定其天然构象。通常，氨基酸在液体蛋白制剂中用作赋形剂，以增加缓冲系统 pH 值、稳定天然蛋白质结构，提高配方的稳定性^[39]。常用的有甘氨酸^[40]、色氨酸^[41]、精氨酸^[42]、组氨酸、丝氨酸^[43]等。只有几项研究研究了氨基酸在固态蛋白质配方中作为稳定辅料的作用¹²⁻¹⁵^[44-47]。例如，发现组氨酸在高于缓冲所需的浓度下添加到冻干配方中时，可以改善乳酸脱氢酶的稳定性^[46]。Forney-Stevens 等^[48]分别使用 15 种氨基酸对蔗糖基蛋白质进行冻干，并对其稳定性进行监测，发现氨基酸的保护机制也具有小分子保护剂的作用，可以作为小分子填充在自由体积当中，从而提高蛋白质稳定性。Osterberg 等^[49]研究发现，冷冻干燥过程中的组氨酸在 pH 为 6 时不会结晶，但在较高和较低的 pH 环境下很容易结晶，而晶体对蛋白质的稳定性起反作用，应当尽量避免。对于一些氨基酸保护剂，如果加入足够的有机或无机酸以形成各自的盐，可以完全抑制结晶^[50-51]。

1.4.3 多元醇类冻干保护剂

常用的多元醇类冷冻干燥保护剂有山梨醇^[52]、甘露醇^[53]、甘油^[54]等。其中，甘露醇被认为是良好的填充剂，但有研究发现，甘露醇易在冻干过程中形成甘露醇半水合物(mannitol hemihydrate, MHH)，这种甘露醇半水合物可以释放水到成品中，导致最后的冻干产品无法保持稳定^[55]。

1.4.4 高分子类冻干保护剂

高分子量冷冻保护剂已广泛用于血液制品的冷冻保存，最广泛使用的聚合物有右旋糖酐 (Dex)、羟乙基淀粉 (HES)、聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)、聚乙二醇 (PEG)等。除 P