疫苗温度标签的制备及显色动力学

张嘉帅[1]，钱静[1]，俞胡斐[1]，崔小波[2]
（1.江南大学 机械工程学院，江苏 无锡 214122；2.江苏哲勤科技有限公司，江苏 无锡 214001）

摘要：目的 以 2,4-己二炔-1,6-二烷基脲为原料制备疫苗温度标签，并对其重结晶和共结晶的制备，以及显色动力学规律进行研究，为疫苗温度标签的商业化应用提供理论指导。**方法** 通过使用不同溶剂对 2,4-己二炔-1,6-二乙基脲的重结晶，以及不同比例的 2,4-己二炔-1,6-二乙基脲和 2,4-己二炔-1,6-二丙基脲的共结晶进行实验，确定最适宜的配方，并对其显色动力学规律进行研究，利用分光密度仪对光密度值进行测定，进而通过计算得到反应活化能。**结果** 不同溶解度的溶剂重结晶 2,4-己二炔-1,6-二乙基脲后的固相聚合反应速率不同，通过实验发现以 $m_{乙醇}$∶$m_{水}$=3∶1 的混合溶液为溶剂重结晶，以及 m_{KE}∶m_{KPR}=2∶1 共结晶得到的产物热反应性较好，颜色变化较为鲜明，且通过计算得到该固相聚合反应的活化能为 31.94 kJ/mol。**结论** 将 2,4-己二炔-1,6-二烷基脲作为新型的化学型疫苗温度标签，其视觉响应信号易于识别；通过重结晶和共结晶的改性来匹配不同种类的疫苗，可直观反映疫苗在冷链运输、保存和使用环节的质量。

关键词：疫苗温度标签；2,4-己二炔-1,6-二烷基脲；重结晶；共结晶；活化能
中图分类号：TQ421.3 **文献标识码：**A **文章编号：**1001-3563(2021)11-0060-07
DOI：10.19554/j.cnki.1001-3563.2021.11.009

Preparation and Color Kinetics of Vaccine Vial Monitor

ZHANG Jia-shuai[1], *QIAN Jing*[1], *YU Hu-fei*[1], *CUI Xiao-bo*[2]
(1.School of Mechanical Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;
2.Jiangsu Zheqin Technology Co., Ltd., Wuxi 214001, China)

ABSTRACT: The re-crystallization of 2,4-hexadiyn-1,6-dialkylurea, the preparation of co-crystallization and its color development kinetics were studied, which provided theoretical guidance for the commercial application of Vaccine vial monitor. Through the re-crystallization of 2,4-hexadiyn1,6-diethylurea with different solvents and the co-crystallization test of 2,4-hexadiyn-1,6-bis(ethylurea)(KE) and 2,4-hexadiyn-1,6-bis(propylurea)(KPr) with different proportions, the most suitable formula was determined, and its color development kinetics was studied. The optical density was measured by spectrophotometer. The results showed that the solid-state polymerization reaction rates of recrystallizing 2,4-hexadiyne-1,6-bis(ethylurea) with different solubility solvents were different. Through experiments, it is found that the product obtained by recrystallization with the mixed solution of $m_{ethanol}$∶m_{water}=3∶1 and cocrystallization at m_{KE}∶m_{KPR}=2∶1 has better thermal reactivity and distinct color change, and the activation energy of the solid-state polymerization reaction is calculated to be 31.94 kJ/mol. 2,4-hexadiyn-1,6-dialkylurea is a new chemical time and temperature indicator, and its visual response signal is easy to recognize. Matching different kinds of vaccines by re-crystallization

收稿日期：2020-10-12
基金项目：国家重点研发计划（2018YFC1603300）；无锡科技局产业前瞻与关键技术（现代农业）（N20193008）
作者简介：张嘉帅（1996—），女，江南大学硕士生，主攻食品储运保鲜。
通信作者：钱静（1968—），女，博士，江南大学教授，主要研究方向为运输包装。

and modification of co-crystallization can directly reflect the quality of vaccines in cold chain transportation, preservation and use.

KEY WORDS: vaccine vial monitor; 2,4-hexadiyn-1,6-dialkylurea; re-crystallization; co-crystallization; activation energy

在生物制品在贮运过程中，温度对其质量的影响是不可预测的，生物制品外包装上标注的有效期不能准确地表示其实际的质量。疫苗作为特殊的生物制品，主要由减毒活疫苗、多糖物质、异体蛋白物质等具有生物学活性的物质构成，在储运过程中温度是其效价最主要的影响因素[1]。时间-温度指示器（Time-Temperature Indicator，TTI）可以将疫苗的 2 个关键要素（时间和温度）与疫苗的稳定性联系起来[2]，并能在生产到冷链运输、储存、接种的整个过程中，全程监视疫苗随时间和温度的累积效应，使疫苗的合理效价不受损害，保障接种的安全性和有效性。TTI 是附于包装或产品上的简单装置或标签，能够记录此产品的时间温度历程，作为一种智能包装已经被广泛地研究和应用，并逐渐向轻盈小巧、价廉方便的方向发展。

1　疫苗温度标签

疫苗温度标签（Vaccine Vial Monitor，VVM）是一种粘贴于疫苗外包装上的指示器类产品，是利用丁二炔作为指示剂的聚合型 TTI，其具有共轭三键结构（R_1—C≡C—C≡C—R_2），在温度、辐射等外界条件的刺激下会发生固相聚合反应[3]，通过时间和温度的共同作用使标签颜色发生改变，从而记录一段时间内疫苗制品的累积热暴露量，从而间接反映疫苗制品的效价信息[4]。由联合国适宜卫生科技组织（PATH）与美国 Temp-time 公司合作，将丁二炔用于 VVM 产品的生产中，研发出了适用于疫苗制品冷链运输的 TTI。在 Temp-time 公司已授权的专利中（如美国专利 No.4384980[5]和 No.8269042[6]等）提到了丁二炔类的制备方法，其未对不同种类 VVM 的配方和颜色变化规律进行详细阐述。

我国直到 2010 年前后，开始有文献对 VVM 的可行性进行研究。方国良等[7]探究了 VVM 标签在 A 群 C 群脑膜炎球菌多糖结合疫苗上的应用。严水兵等[8]研究了在不同温度和光照条件下 VVM 的变色情况，其应用到的 VVM 均从 Temp-time 公司购入。宋蕊等[9]探究了 VVM 的原料（2,4-己二炔-1,6-二乙基脲）的合成和聚合反应，其未对此类物质变色的机理、配方和热反应性等进行深入研究。

文中将基于宋蕊等[9]的探究结果和 Temp-time 公司已授权的专利进一步研究丁二炔的变色机理。前期按照专利中的制备方法得到 2,4-己二炔-1,6-二烷基脲粉末，发现在 60 ℃时其变色规律是由白色变为深蓝色，在 4 ℃时颜色变化非常缓慢，基本符合疫苗的失效情况。此研究以被乙基和丙基取代的 2,4-己二炔-1,6-二烷基脲（2,4-己二炔-1,6-二乙基脲（KE）和 2,4-己二炔-1,6-二丙基脲（KPr））为基本原料，用重结晶和共结晶实验对其进行改性，并对其不同热反应性的指示剂配方、印刷成本和发生固相聚合反应的显色动力学规律进行深入的研究，计算得到该指示剂的聚合反应活化能。此研究对了解该指示剂的反应机理和可应用的领域提供参考，也为以后将该指示剂更好地应用到油墨生产中提供理论基础。

2　实验

2.1　材料和仪器

主要实验材料：炔丙胺，98%，分析纯，国药集团；乙基异氰酸酯，98%，分析纯，上海阿拉丁生化科技股份有限公司；丙基异氰酸酯，98%，分析纯，上海阿拉丁生化科技股份有限公司；四氢呋喃，99.5%，超干，国药集团；高纯氧气，无锡鑫锡仪科技有限公司；氯化亚铜、N'N'N'N'-四甲基乙二胺（TMEDA）、盐酸、甲醇、丙酮、冰乙酸、异丙醇、无水乙醇、二甲基亚砜，分析纯，国药集团；石油醚（30~60 ℃），分析纯，国药集团；聚氨酯清漆，美国宣伟涂料有限公司。

主要实验仪器：水浴锅，DK-S22 电热恒温水浴锅，上海精宏实验设备有限公司；真空泵，SHK-III 循环水式多用真空泵，郑州科泰实验设备有限公司；恒温恒湿箱，上海精宏实验设备有限公司；真空干燥箱，DWZK-25H 低温真空干燥系统，上海森信实验仪器有限公司；磁力搅拌器，RO5 磁力搅拌器，广州仪科（IKA）实验室技术有限公司；差示扫描量热仪（DSC），DSC Q2000，美国沃特世公司；粒度分析仪，Master Sizer 2000 激光粒度分析仪，英国马尔文仪器公司；分光密度仪，X-Rite eXact，美国爱色丽公司。

2.2　原材料的制备方法

2.2.1　KE 的合成

将 60 mL 炔丙胺和 100 mL 乙基异氰酸酯通过 350 mL 四氢呋喃稀释后，加到烧瓶中并开动搅拌器，反应 1.5 h 合成单脲；加入 2.5 g 氯化亚铜和 6 mL TMEDA 后，通入氧气，继续反应 2.5 h，加入体积分

数为 10%的盐酸溶液，使反应失活，待体系稳定后过滤产物；用体积分数为 10%的盐酸、水进行洗涤抽滤，在 $V_{甲醇}$：$V_{盐酸}$=1：1（盐酸的体积分数为 10%）的混合液中搅拌并过滤，然后依次用水、甲醇、丙酮洗涤，得到 KE 的未结晶产物。

用 100 ℃的 500 mL 乙酸进行重结晶后过滤，再分别用水和石油醚洗涤；在 15 ℃低温真空下干燥 2 h，得到白色粉末状固体。将其放入避光的试样瓶中，采用真空包装并冷冻保存，产率约 68%，其合成路线见图 1。

2.2.2　KPr 的合成

除了将 55 mL 炔丙胺和 83 mL 丙基异氰酸酯通过 250 mL 四氢呋喃稀释合成单脲以外，其他方法与 KE 合成相同，得到黄色的 KPr 未结晶产物。将粗结晶产物溶解在 100 ℃的 1 L 乙酸中进行重结晶，洗涤并抽滤；低温真空干燥 2 h，得到白色粉末状固体产物。将其放入避光的试样瓶中，采用真空包装并冷冻保存，产率约为 53.4%，其合成路线见图 2。

2.3　原材料的改性方法

2.3.1　KE 的重结晶实验

为了改变 KE 的印刷适性和热反应后的颜色变化规律，对 KE 进行重结晶实验。将 0.4 g KE 加入 9.6 g 异丙醇、乙醇水溶液（$m_{乙醇}$：$m_{水}$=3：1）、乙酸、乙酸水溶液（$m_{乙酸}$：$m_{水}$=3：1）、二甲基亚砜中；磁力搅拌并加热至 90 ℃，观察 KE 溶解情况，当没有 KE 颗粒时停止搅拌和加热；使晶体慢慢析出，当温度冷却至 35 ℃时，过滤产物，真空干燥 1~2 h，放入样品瓶中待用。

2.3.2　KE 和 KPr 的共结晶实验

为了改变 KE 和 KPr 单体的热反应性，该实验将 KPR 和 KE 按不同质量比例分组（2：1，1：1，1：2，共 1 g）分别在 100 ℃下加入 10 mL 乙酸中，加热并磁力搅拌使其溶解；当温度达到 110~115 ℃时，停止加热，并将其冷却到 20 ℃，使产物充分沉淀；沉淀过滤后，用石油醚（60~90 ℃）洗涤，低温真空干燥 1~2 h，放入样品瓶中待用。

2.4　热反应实验

取重结晶和共结晶实验后的 KE 和 KPr 产物各 0.1 g，放入透明比色皿中，置于 37 ℃烘箱中，观察不同时间的颜色变化情况，确定该产物热反应性能的高低，选择颜色变化较为鲜明，且热反应性能适中的配方为最终方案。

2.5　烷基脲油墨的制备方法

为了更好地对烷基脲粉末进行显色动力学研究，需要把其均匀分散到分散溶剂中制备成油墨后，涂布到标签底纸上，以便定量测量其热反应实验后的颜色变化。该研究将烷基脲粉末混合在一定质量的水性透明聚氨酯清漆中，在低温条件下搅拌 4 h，使其均匀分散，并得到 0.5 mmol/g 的混合液。将混合好的清漆涂布到提前裁好宽度为 3 cm 的标签底纸上，涂布厚度为 40 μm，自然风干待用。

2.6　显色动力学参数的确定

光密度值（OD）可以定量地反映不同物质固相聚合的程度，实验采用 X-rite 分光密度仪测定光密度值。由于标签的颜色变化为由无色变为蓝色，其主色调为青色（cyan），一般用来表征蓝绿色的颜色变化，以青色为专色密度代表光密度值，对标签的固相聚合程度进行表征。将涂布好的标签底纸分别放入 4，15，25，37，50 ℃的恒温烘箱中，每隔一段时间测定样品光密度数值，绘制不同温度下的光密度-时间变化曲线。对曲线进行拟合，计算得到该指示剂在不同温度下的平均反应速率，并利用 Arrenhenius 方程来求取时间温度指示剂反应体系的活化能。

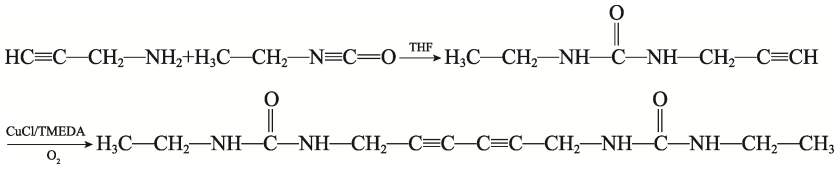


图 1　2,4-己二炔-1,6-二乙基脲合成路线

Fig.1 Synthesis Route of 2,4-Hexadiyn-1,6-Bis(Ethylurea)

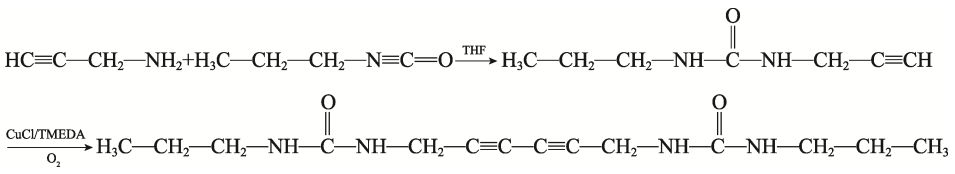


图 2　2,4-己二炔-1,6-二丙基脲合成路线

Fig.2 Synthesis Route of 2,4-Hexadiyn-1,6-Bis(Propylurea)

3　结果与分析

3.1　KE 的重结晶实验

3.1.1　KE 的重结晶溶剂的选择

通过研究发现，由于在室温条件下能够溶解足够浓度的丁二炔单体及其混合物的溶液，可以降低其加工成印刷指示装置的成本[6]，因此需要选择对 KE 有良好室温溶解性的溶剂，以达到更好的经济性。该实验溶剂的选择依据为在 20 ℃下 KE 在不同溶剂中溶解度的大小，溶解度由小到大的溶剂排序：异丙醇（溶解度为 0.09%）<乙醇/水（质量比为 3∶1）（溶解度为 0.18%）<乙酸/水（质量比为 3∶1）<乙酸<二甲基亚砜（溶解度为 4%）。KE 用不同溶剂的重结晶实验现象见表 1。

由表 1 可知，在重结晶实验溶解过程中，KE 迅速溶解于二甲基亚砜溶剂中，未溶解于异丙醇中，且 KE 提前发生聚合反应，导致溶液迅速变成蓝灰色；在温度降低至 35 ℃时，二甲基亚砜溶剂中的 KE 未析出，直到降温至 4 ℃时才开始析出。在重结晶实验中不能选择 KE 溶解度较小的溶剂（如异丙醇），会导致粉末由于发生聚合反应而变色；也不能选择 KE 溶解度较大的溶剂，其溶解度较大导致 KE 难以析出且产率较低，为了保证 KE 充分析出，要快速过滤，以免再次溶解，这增加了制备的难度。

3.1.2　热反应实验的颜色变化

取粗结晶的 KE 和用异丙醇、乙醇/水（质量比为 3∶1）、乙酸/水（质量比为 3∶1）、乙酸、二甲基亚砜溶剂重结晶的 KE 各 0.1 g，放入透明比色皿中，置于 37 ℃烘箱中观察不同时间的颜色变化，见图 3。

由图 3 可知，未结晶和不同溶剂重结晶的产物初始颜色除异丙醇外几乎为白色，4 d 后均有不同程度的变色，证明未结晶和重结晶产物都为活性相。由于 KE 在异丙醇中的溶剂度过小，导致重结晶过程中提前发生聚合反应变为浅蓝色，故没有对其进行热退火处理[5]。其余重结晶产物经过热退火处理都会以不同速率颜色变深，它们的相对反应性从高到低排序：二甲基亚砜>乙醇/水（质量比为 3∶1）>乙酸>乙酸/水（质量比为 3∶1）>未结晶。

使用不同的溶剂对 KE 进行重结晶实验可以改变颜色变化的速率，而且 KE 溶剂的溶解性的大小与其热反应性的高低没有明显的关系。由图 3 可知，虽然用二甲基亚砜重结晶 KE 的热反应性明显增高，但由于其在重结晶过程中难以析出，所以选择用乙醇/水（质量比为 3∶1）重结晶得到的 KE 为原料进行后续实验，其颜色变化较为鲜明且易于制得。后文提到的 KE 均代表用乙醇/水（质量比为 3∶1）为溶剂重结晶得到的 KE。

3.2　KPr 重结晶热反应实验的颜色变化

去粗结晶 KPr 和乙酸重结晶 KPr 各 0.1 g，放入透明比色皿中，置于 37 ℃烘箱中观察不同时间的颜色变化，见图 4。

由图 4 可知，未重结晶产物 2 d 后仍为黄白色，以乙酸为溶剂的重结晶产物变为蓝灰色，证明未重结晶粗结晶产物为非活性相，用乙酸重结晶产物为活性相，说明重结晶可以使某些非活性相活化。

3.3　KE 和 KPr 的共结晶实验

3.3.1　共结晶机理

共结晶指在其晶格中包含至少 2 种不同组分的结晶组合物，其中新的晶格表现出不同的热性质，并且不同于单独组分的晶格。共结晶组合物[10]改变反应性的原因是固态分子堆积的变化，通过引入其他具有相似化学结构的炔属分子来改变结晶堆积，会影响聚合过程的活化能和显色动力学。该实验选用不同比例的 KE 和 KPr 共结晶来改变单体的热反应性。

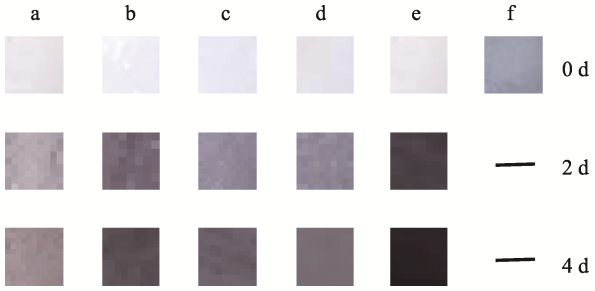
3.3.2　热反应实验的颜色变化

将 KE 和 KPR 按不同质量比例组分（2∶1，1∶1，1∶2）重结晶产物和对照组（KE，KPR）各 0.1 g 放入相同透明比色皿中，置于 37 ℃烘箱中观察颜色变化，见图 5。

表 1　KE 用不同溶剂重结晶过程中溶解和析出的时间

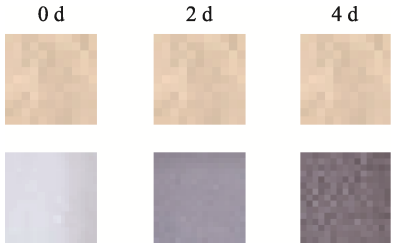
Tab.1 Dissolution and precipitation time of KE in re-crystallization with different solvents

组别	溶剂	重结晶过程中的溶解和析出现象	
		升温至 90 ℃后，KE 全部溶解时间/min	降温至 35 ℃后，KE 开始析出时间/min
a	未结晶	5	10
b	乙醇/水(质量比为 3∶1)	15	0.5
c	乙酸	5	10
d	乙酸/水(质量比为 3∶1)	5	10
e	二甲基亚砜	0.5	未析出
f	异丙醇	未溶解	



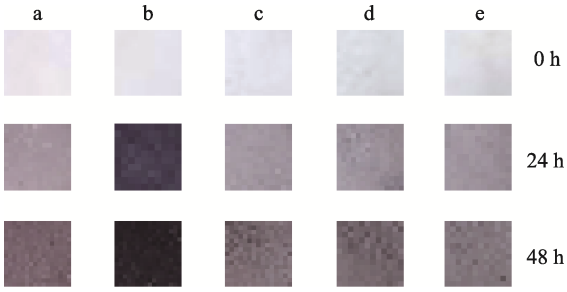
注：每行从左到右分别为未结晶、乙醇/水、乙酸、乙酸/水、二甲基亚砜、异丙醇

图 3　在 37 ℃下 KE 不同溶剂重结晶随时间变色示意
Fig.3 Color change of KE re-crystallization in different solvents with time at 37 ℃



注：第 1 行为 KPr 未结晶，第 2 行为乙酸重结晶

图 4　在 37 ℃下随时间变色示意
Fig.4 Color change over time at 37 ℃



注：每行从左到右分别为 KE，m_{KE}∶m_{KPr}=2∶1，m_{KE}∶m_{KPr}=1∶1，m_{KE}∶m_{KPr}=1∶2，KPr

图 5　在 37 ℃下不同比例 KE 和 KPr 共结晶随时间变色示意
Fig.5 Color change of co-crystallization with different proportion of KE and KPr at 37 ℃ over time

通过图 5 的颜色对比可以看出，m_{KE}∶m_{KPr}=2∶1 共结晶产物的热反应性同未共结晶组相比大大提高，其次是原料 KE，其他共结晶产物的热反应性相差不大，颜色变化不明显，说明将 KE 和 KPr 用不同比例共结晶可以改变烷基脲单体的热反应性。由于 m_{KE}∶m_{KPr}=2∶1 共结晶产物颜色变化十分鲜明，故选其为原料进行后续实验。

4　结晶烷基脲的显色动力学

由上述实验结果可知，由于以 $m_{乙醇}$∶$m_{水}$=3∶1 溶液为溶剂重结晶和 m_{KE}∶m_{KPr}=2∶1 共结晶得到的产物颜色变化较为鲜明，因此选择将 KE 用 $m_{乙醇}$∶$m_{水}$=3∶1 溶液重结晶后和 KPr 按质量比为 2∶1 共结晶（以下简称为 KEP21）的产物为原料，研究其显色动力学规律。

4.1　时间和温度对 KEP21 热反应的影响

4.1.1　时间对光密度值的影响

将涂布厚度为 40 μm，质量摩尔浓度为 0.5 mmol/g 的 KEP21 样品于 37 ℃恒温烘箱中放置 0，1，2，3，4，5，6，7，8 d 后观察颜色的变化，并测量其光密度值，光密度值-时间曲线见图 6。

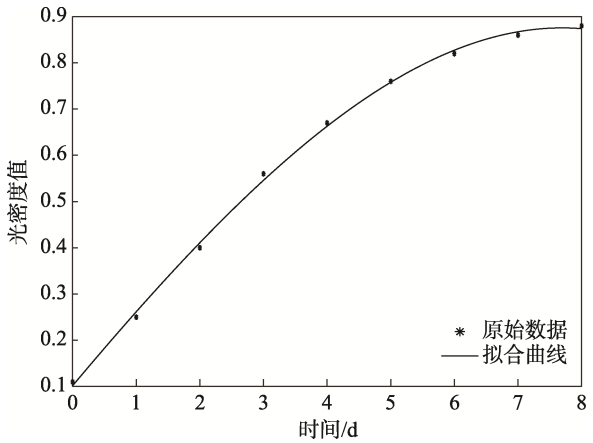


图 6　在 37 ℃下不同时间 KEP21 样品的光密度值曲线
Fig.6 Curve of optical density value of KEP21 sample at 37 ℃ at different time

由图 6 可知，随着 KEP21 在恒温烘箱时间的增加，单位时间内的光密度值速度先增后减，说明 KEP21 发生聚合反应的速率先增后减。

4.1.2　温度对光密度值的影响

记录涂布厚度为 40 μm，质量摩尔浓度为 0.5 mmol/g 的 KEP21 于 4，15，25，37，50 ℃下放置 7 d 后的颜色变化，并测量其光密度值，光密度值-温度曲线见图 7。

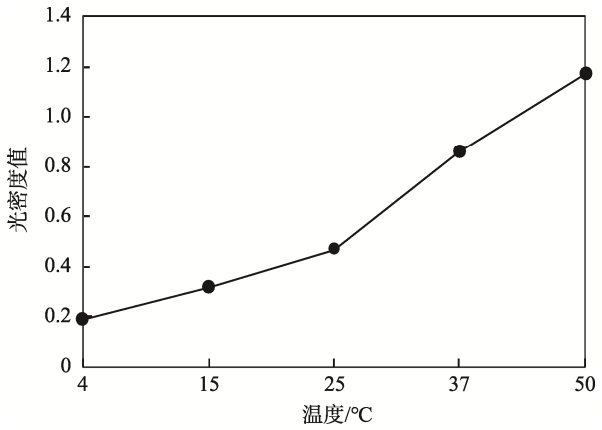


图 7　不同温度下 KEP21 样品放置 7 d 的光密度值曲线
Fig.7 Curve of optical density value of KEP21 sample for 7 d at different temperatures

由图 7 可知，温度的升高会使光密度值增加，也

就是该指示剂的固相聚合反应速率越快，颜色的变化越明显，可以有效地指示相关食品的货架期寿命和疫苗的效价。

4.1.3　时间和温度对颜色变化的影响

将涂布厚度为 40 μm，质量摩尔浓度为 0.5 mmol/g 的 KEP21 样品放置于 4，15，25，37，50 ℃的恒温烘箱中，分别在放置前和放置 1，2，3，4，5，6，7，8 d 后观察颜色的变化，见图 8。

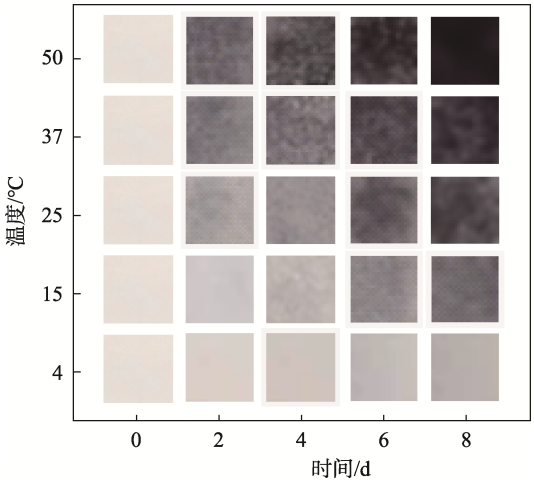


图 8　不同温度和不同时间下 KEP21 样品颜色变化
Fig.8 Color change diagram of KEP21 sample at different temperature and time

在不同温度下放置一定时间后，随着温度的升高，蓝色越来越深，甚至变为黑色。该时间温度指示剂在 37 ℃时，大约 7~10 d 颜色到达终点，在 4 ℃的低温下，随着时间的累积，颜色也会发生缓慢的变化，该规律与在冷链运输中生物制品在高温下更易失效这一事实相吻合，可以比较准确地反映该疫苗的效价。

可以根据 VVM 在不同时间不同温度的颜色变化规律与各类疫苗在参照温度下的热稳定性测试结果来进行匹配，并验证 VVM 的可靠性[7]。

4.2　活化能的确定

利用 Arrenhenius 方程来求该指示剂聚合反应的活化能 E_a 值。由实验测定质量摩尔浓度为 0.5 mmol/g 的 KEP21 样品在不同温度条件下加热一定时间后的光密度值，见图 9。

将单位时间内光密度值的变化定义成表观的聚合反应速率，并计算得到每小时在 15，25，37，50 ℃下的平均聚合反应速率分别为 1.2×10^{-3}，2.0×10^{-3}，4.0×10^{-3}，5.6×10^{-3}，从数据中可以发现，KEP21 样品的温度越高，其聚合反应的速率就越大。对速率方程 $v=kc_A^n$ 的两边同时取对数得到：

$$\ln v=\ln k+n\ln c_A \tag{1}$$

式中：v 为反应的速率；k 为反应速率常数；n 为反应级数；c_A 为反应起始的浓度。

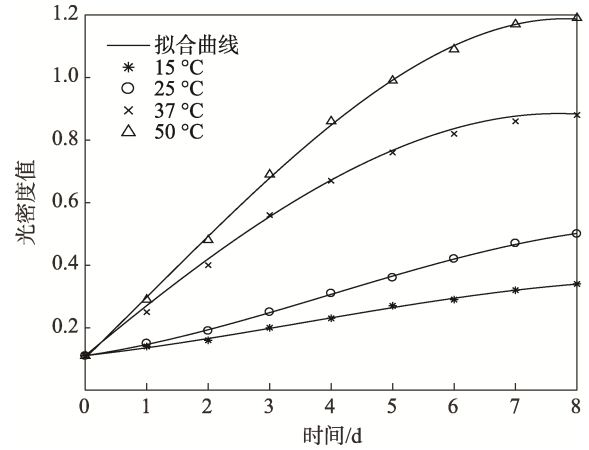


图 9　不同温度、不同时间下 KEP21 样品的光密度值曲线
Fig.9 Curves of optical density value of KEP21 sample at different temperature and time

KEP21 样品固相聚合反应中温度对反应速率的影响遵循 Arrhenius 方程，对其两边取对数得：

$$\ln k=\ln k_0-\frac{E_a}{RT} \tag{2}$$

式中：k 为反应的速率常数（h^{-1}）；k_0 为指前因子（对于指定反应是一个常数）（h^{-1}）；E_a 为活化能（kJ/mol）；R 为摩尔气体常数（kJ/(mol·K)）；T 为热力学温度（K）。

将式（2）代入式（1）得：

$$\ln v=-\frac{E_a}{RT}+\ln k_0+n\ln c_A \tag{3}$$

以 $\ln v$ 对 $\frac{1}{T}$ 作图，见图 10，若两者存在明显的线性关系，则可以通过线性拟合的方式得到该直线的斜率，根据式（3）可求 E_a 值[11]。

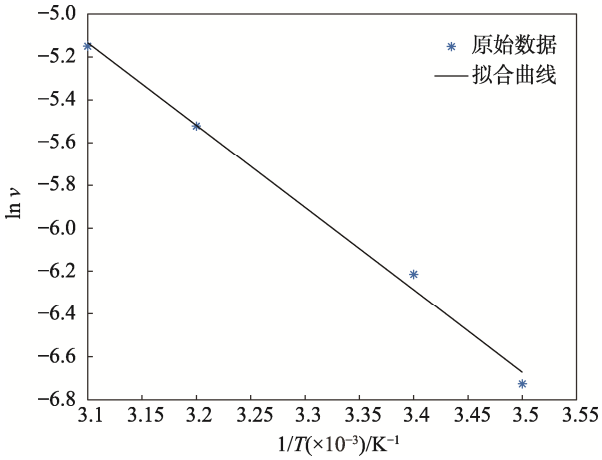


图 10　$\ln v$-1/T 关系曲线
Fig.10 Relation between reaction rate and temperature

对图 10 中的曲线进行拟合，得其相关系数 R^2 为 0.987，由此可以表明 $\ln v$ 与 $\frac{1}{T}$ 之间有明显的线性关系[12]，拟合曲线方程见式（4）。

$$\ln v=-3844.1\frac{1}{T}+6.7827 \tag{4}$$

得直线斜率 K=−3844.1，由式（3）可得：

$$K=-\frac{E_a}{R} \tag{5}$$

该体系的活化能 E_a=31.94 kJ/mol。TTI 与食品的活化能需要进行匹配[13]，它们之间的差值必须小于 25 kJ/mol，TTI 才具有可靠性。目前，用 Arrhenius 方程建立数学模型的方式用于 TTI 与食品货架期寿命的匹配，也可以用于该指示剂预测疫苗制品的效价，为了保证指示剂能有效地监控疫苗，所选指示剂的有效期应略短于其相匹配疫苗的稳定期[14]，该模型的适用性和普遍性还有待进一步检验[15]，寻求并优化一种新的显色动力学模型，使其能够更好地使该指示剂与疫苗的效价匹配，将会成为研究重点。

5 结语

通过对 KE 和 KPr 单体进行改性实验的研究，确定了适用于疫苗的 TTI 反应体系为 KE 单体用 $m_{乙醇}$：$m_{水}$=3：1 溶剂重结晶后和 KPr 单体按质量比为 2：1 共结晶所得到的产物，该产物的固相聚合反应速率显著增加，在时间和温度的累积下，指示剂颜色由白色变为深蓝色，颜色变化鲜明，易于识别。将其在不同温度下发生聚合反应时的显色规律进行了研究，根据在 37 ℃下反应 7~10 d 颜色到达终点，且在 4 ℃的低温下，颜色会发生缓慢变化的变色规律，以及根据不同温度下的反应速率得到了指示剂的活化能为 31.94 kJ/mol，以此为依据可以将该疫苗温度指示剂与相关疫苗进行匹配。

参考文献：

[1] 陈怀恭，张军哲，梁勇，等. 保存温度和时间对狂犬病疫苗效力稳定性的影响[J]. 微生物学免疫学进展，2001, 29(2): 30—33.
CHEN Huai-gong, ZHANG Jun-zhe, LIANG Yong, et al. The Effect of Keeping Temperature and Time on the Stability of Potency of Rabies Vaccine[J]. Advances in Microbiology and Immunology, 2001, 29(2): 30—33.

[2] 万正刚，陈蕴智，张正健. 时间-温度指示器在疫苗运输包装中的应用[J]. 包装工程, 2016, 37(3): 100—102.
WAN Zheng-gang, CHEN Yun-zhi, ZHANG Zheng-jian. Application of Time-Temperature Indicator in the Transport Packaging of Vaccine[J]. Packaging Engineering, 2016, 37(3): 100—102.

[3] 成欢，朱光明，宋蕊. 二乙炔类时间温度指示剂[J]. 化学进展, 2013, 25(12): 2113—2118.
CHENG Huan, ZHU Guang-ming, SONG Rui. Diacetylenic Time-Temperature Indicators[J]. Progress in Chemistry, 2013, 25(12): 2113—2118.

[4] 王瑶瑶，徐文，黄昀，等. 疫苗温度控制标签在疫苗冷链储运中的应用[J]. 生物产业术, 2018(4): 90—93.
WANG Yao-yao, XU Wen, HUANG Yun, et al. Application of Vaccine Vial Monitor in the Storage and Transportation of Vaccine Cold Chain[J]. Bio-Industry Technology, 2018(4): 90—93.

[5] GORDHANBHAL N, MORRISPLAINS N J. Co-Crystallized Acetylenic Compounds: US, 4384980[P]. 1983-05-24.

[6] RAY H, LEE J, MIKHAIL K, et al. Crystallized Diacetylenic Indicator Compounds and Methods of Reparing the Compounds: US, 8269042 B2[P]. 2012-09-18.

[7] 方国良，马波，沈峰，等. VVM 标签在 A 群 C 群脑膜炎球菌多糖结合疫苗上的应用[J]. 中国生物制品学杂志, 2015, 28(9): 897—901.
FANG Guo-liang, MA Bo, SHEN Feng, et al. Application of VVM Label in Groups A and C Meningococcal Polysaccharide Conjugate Vaccine[J]. Chinese Journal Biologicals, 2015, 28(9): 897—901.

[8] 严水兵，孟波，杨烨等. 疫苗有效性监测卡在不同温度与光照条件下变色情况研究[J]. 国际生物制品学杂志, 2018, 41(1): 9—11.
YAN Shui-bing, MENG Bo, YANG Ye, et al. Study on the Discoloration of Vaccine Effectiveness Monitoring Card under Different Temperature and Light Conditions[J]. International Journal of Biological Products, 2018, 41(1): 9—11.

[9] 宋蕊，朱光明，谢建强，等. 2,4-己二炔-1,6-二乙基脲的合成及聚合反应[J]. 高分子材料科学与工程, 2013(5): 1—4.
SONG Rui, ZHU Guang-ming, XIE Jian-qiang, et al. Synthesis and Polymerization of 2,4-hexadiyne-1,6-diethylurea[J]. Science and Engineering of Polymer Materials, 2013(5): 1—4.

[10] 成欢，朱光明，宋蕊. 时间温度指示剂研究进展[J]. 化学进展, 2013, 32(4): 885—890.
CHENG Huan, ZHU Guang-ming, SONG Rui. Progress of Time-Temperature Indicators[J]. Progress in Chemistry, 2013, 32(4): 885—890.

[11] ZHENG Guang-lin, QIAN Jing, et a1. Preparation of Time-Temperature Indicator Reaction System Based on Glucoamylase[J]. Food Science, 2013, 12(34): 82—85.

[12] WU Dan, WANG Ya-jun, CHEN Jian-chu, et al. Preliminary Study on Time-Temperature Indicator(TTI) System Based on Urease[J]. Food Control, 2013, 34(1): 230—234.

[13] KIM K, KIM E, LEE S J. New Enzymatic Time-Temperature Integrator (TTI) That Uses Laccase[J]. Journal of Food Engineering, 2012, 113(1): 118—123.

[14] 舒俭德. 疫苗热标签[J]. 中国生物制品学杂志, 2010, 23(11): 1275—1276.
SHU Jian-de. Vaccine Vial Monitor[J]. Chinese Journal Biologicals, 2010, 23(11): 1275—1276.

[15] 王瑶瑶. 关于疫苗用时间度指示器的经济学评价[D]. 济南：山东中医药大学, 2018: 12—13.
WANG Yao-yao. Economic Evaluation of Time and Temperature Indicator for Vaccine[D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 2018: 12—13.