

# Biyolojik Maddelerin Kurutularak Saklanması: Liyofilizasyon

Züleyha ERGÜN<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Md., Viral Aşı Üretim Laboratuvarı, Ankara

Geliş Tarihi / Received: 06.07.2015, Kabul Tarihi / Accepted: 13.07.2015

**Özet:** Organik maddelerden suyun uzaklaştırılması sürecini tanımlayan liyofilizasyon, günümüzde tüm dünyada gerek sağlık endüstrisinde ve gerekse gıda endüstrisinde çok fazla kullanım alanı bulan bir tekniktir. Bu teknikte azaltılmış basınç (vakum) altında, dondurulmuş haldeki solüsyonlardan suyun uzaklaştırılması ile biyolojik maddeler ve gıdalar, bozulma meydana gelmeden uzun süre saklanabilmektedir. Liyofilizasyonun, uzun bir süreç olması, sıcaklık ve basıncın içinde bulunduğu hassas dengeler üzerine kurulmuş olması gibi dezavantajları bulunmasına rağmen halen dünyada sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Bu teknik, aslen eski bir yöntem olmasına karşın biyolojik ve organik maddelerin saklanmasına ilişkin daha etkin bir teknik geliştirilemediğinden günümüzde tüm dünyada halen etkinliğini ve önemini korumaktadır. Bununla birlikte prensipte aynı olmakla birlikte liyofilizasyon teknolojisi sürekli geliştirilmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Liyofilizasyon, liyofilizasyon basamakları, liyofilizasyon dezavantaj/avantajı, liyofilizasyon mekanizması, liyofilizasyon metotları (dondurma, birincil kurutma, ikincil kurutma)

## Protection of biological materials by drying: Lyophilization

**Summary:** Lyophilization which defines the process of evaporating the water from organic materials is a widely used technique over the world including health and food industries. This technique provides long term storing of biological materials and food by removing the water from frozen solutions under low pressure (vacuum). Although lyophilization has some disadvantages such as being a time taking process and built delicate balances involving temperature and pressure, it is still commonly used over the world. Even though it is originally an old technique, there has not been developed a more effective technique for long term storing of biological and organic materials yet. For this reason, lyophilization still protect its importance and effectiveness. Though their basic principles are the same, novel lyophilization techniques are continuously developing.

**Key words:** Lyophilization, Lyophilization disadvantages/advantages, Lyophilization mechanism, Lyophilization methods (freezing, primary drying, and secondary drying), Lyophilization steps

## Giriş

Su hücreler içerisindeki biyokimyasal aktiviteleri destekleyen evrensel bir çözücüdür. Bu sayede canlılık işlemleri ve metabolik aktiviteler kesintisiz devam etmektedir. Daha basit şekliyle; su olmadığında hayat diye tanımladığımız döngü durmaktadır. Dolayısı ile su hayat için esansiyeldir. Ancak aynı zamanda su, depolanmış ürünlerin bozulmasında da önemli bir rol oynamaktadır [7]. Özellikle bozulma ve çürüme organizmalarının çoğalması ve otoliz süreci için de gereken ortamı sağlamaktadır. Bu sebeplerden dolayı çabuk bozulmaya meyilli ürünlerin dayanıklılığının artırılması için suyun bu ürünlerden uzaklaştırılması gerekmektedir [3]. Organik maddelerden suyun uzaklaştırılması sürecini liyofilizasyon ve freeze drying terimleri tanımlamaktadır. Bu iki terim kökende aynı süreç, prensip ve meka-

nizmaları tanımlamakla birlikte, “liyofilizasyon” terimi daha çok farmasötik ve medikal endüstride kullanılırken; “freeze-drying” terimi, daha çok gıda endüstrisinde kullanılmaktadır [8,28].

Liyofilizasyon kısaca, yiyecek ve biyolojik ürünlerin bozulmadan kalmasını sağlamak ve oda sıcaklığında daha kolay depolayabilmek amacıyla bu ürünlerden suyun uzaklaştırılması sürecidir. Daha teknik olarak ifade etmek gerekirse; azaltılmış basınç (vakum) altında dondurulan solüsyonlardan suyun uzaklaştırılması prensibine dayanan bir kurutma yöntemidir [18,22].

Liyofilizasyonun tarihçesi, Eskimoların avladıkları balıkları soğuk, kuru Arktik rüzgarlara maruz bırakarak suyunu uçurması ile başlamaktadır [3].

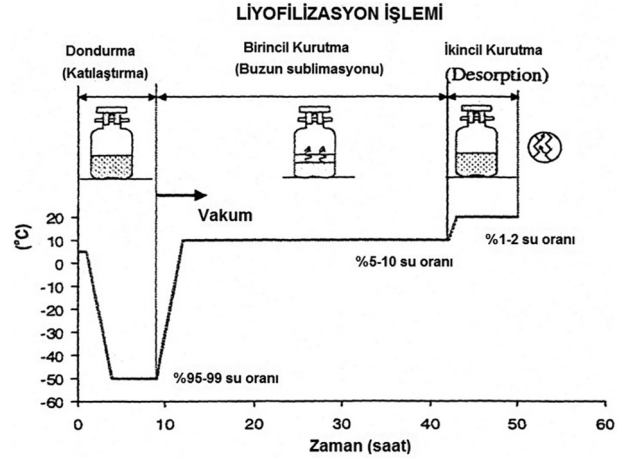
Endüstriyel bir işlem olarak liyofilizasyonun tarihçesi ise oldukça yakın bir tarihe dayanmaktadır. Her ne kadar Altman 1890'lı yıllarda histolojik kesitlerin hazırlanmasında liyofilizasyon tekniğini kullanmış ise de, bu teknik 40 yıl boyunca dikkat çekmemiştir [22]. 1930'lu yılların başlarında, fazla miktarlardaki kan ürünlerinin ve antibiyotiklerin saklanması sorun oluşturmaya başladığında; bu teknik dikkat çekmiş ve hızla geliştirilmiştir. Günümüzde biyolojik olmayan ürünler (reaktif veya ısıya duyarlı kimyasallar), cansız biyoürünler (enzimler, hormonlar, antibiyotikler, vitaminler, kan ürünleri, antikorlar, inaktif aşilar, ayrıca cerrahi veya tıbbi amaçla kullanılan vücut dokuları), canlı organizmalar (yeniden sulandırıldıklarında büyüme ve çoğalması istenen hücreler, örneğin bakteriler, mantarlar ve attenüe canlı viral aşilar), araştırmalarda kullanılacak dokular ve hatta sudan zarar görmüş kitaplar, teksirler, arkeolojik numunelerin korunması ya da müzede sergilenen bitki veya hayvan numuneleri dahi liyofilize edilerek saklanabilmektedir [25,26,29].

Günümüzde liyofilizasyon en sık olarak beşeri sağlık endüstrisinde, veteriner hekimlik ve hayvan sağlığı alanında ve gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. Sağlık endüstrisinde en çok kimyasal bileşikler, parenteral formülasyonlar, aşilar ve teşhis ürünlerinin liyofilizasyonunda kullanılmaktadır. Ancak son zamanlarda protein yapısındaki biyoteknoloji ürünlerinin uzun süreli saklanmasında da liyofilizasyon tekniği kullanılmaya başlanmıştır. Veteriner hekimlik ve hayvan sağlığı alanında ise liyofilizasyon daha çok pet hayvanlarının aşilarında ve büyük sürü aşı uygulamalarında kullanılmaktadır [4]. Liyofilize halde kullanılan bu ürünler sadece hayvan popülasyonunu korumakla kalmaz, aynı zamanda ürünün kalitesini de artırır. Gıda endüstrisinde liyofilizasyon terimi yerine freeze-drying terimi kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde en çok bilinen kurutulmuş ürün kahvedir. Bunun dışında paketlenmesi sırasında ağırlığı sebebiyle maliyetli olan ürünler de (et ve et ürünleri vb.) dondurularak kurutulabilmektedir [13,14,18].

### Liyofilizasyon Basamakları ve Mekanizması

Liyofilizasyon işlemi birbirini takip eden, ardışık üç aşamadan meydana gelmektedir. Bunlar sırasıyla

dondurma, birincil kurutma ve ikincil kurutma basamaklarıdır (Şekil 1) [1,4,12,14,17,19].



Şekil 1. Liyofilizasyon basamakları ve mekanizması [14]

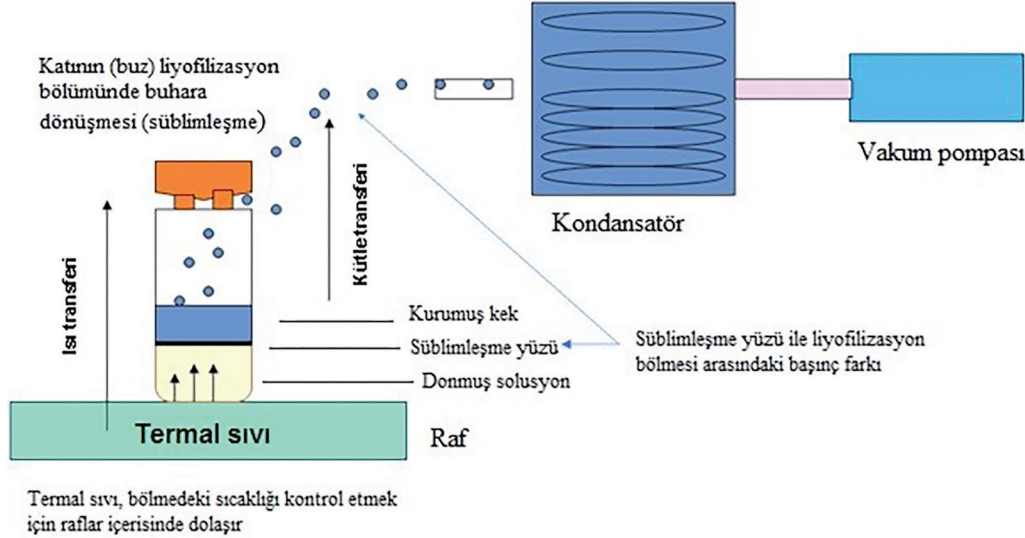
### Dondurma

Liyofilizasyon sürecindeki en önemli adım dondurma basamağıdır. Bu basamak, ürünün köpüklenmesinin ve büzüşmesinin engellenmesi, maddenin görünüşünün ve çözünürlüğünün muhafaza edilmesi, maddenin hayati önem taşıyan özelliklerin korunması ve ısıya bağımlı reaksiyonların en aza indirgenmesi açısından en kritik adımdır. Ayrıca, liyofilizasyon cihazının önceden soğutulması, ürünün kalitesini artırılmasına katkı sağlamaktadır [4,17].

Liyofilizasyon tekniğinde ürünler, ürünün özelliğine bağlı olarak iki yolla donmaktadır. Birinci yolda, liyofilizasyona maruz bırakılan ürünlerin çoğunluğu, öncelikle çözücü olan su ve suyun içinde çözülmüş veya süspansiyon halinde bulunan maddelerden oluşur ki bunlara çözünen madde adı verilmektedir. Dondurularak kurutulmuş ürünlerin çoğu ötektiktirler. Yani bu ürünlerin çoğu, bunların çözünmesini sağlayan çevrelerindeki sudan daha düşük sıcaklıkta donan maddelerin karışımıdır. Sulu süspansiyon soğumaya başladığı zaman, ürün yapısında bulunan çözünen madde konsantrasyonlarında bir takım değişiklikler meydana gelmektedir. Soğuma ilerledikçe, su buza dönüşür ve su buza dönüştükçe çözünen maddelerden ayrılmakta ve bu da çözünen ürünün daha konsantre hale gelmesine sebep olmaktadır. Ürün tamamen donmuş gözükmesine rağmen, gerçekte süspansiyondaki çözünenin tamamı donana

kadar tam bir donma meydana gelmez. Çözücü ile çözünenlerin çeşitli konsantrasyonlarının karışımı, süspansiyonun ötektikini oluşturmaktadır [6]. Sadece ötektik karışımının tamamı donduğu za-

man süspansiyon uygun olarak donmaktadır. Buna ötektik sıcaklığı denilmektedir. Bu, oluşturulacak ürünün stabil olması açısından oldukça önemlidir [6,15] (Şekil 2).



Şekil 2. Liyofilizasyon bölümünün şematik çizimi ve kuruma süreci [14]

Ürünü dondurmanın ikinci yolu ise, süspansiyonun dondurma süreci boyunca cam formasyonunu almasıdır. Ötektik formdan farklı olarak, tüm süspansiyon sıcaklık düştükçe viskoz olmaktadır. Sonuç olarak, ürün cam geçiş noktası adı verilen bir sıcaklıkta donmaktadır. Ürünleri bu şekilde dondurmak oldukça zor bir işlemdir [14,17].

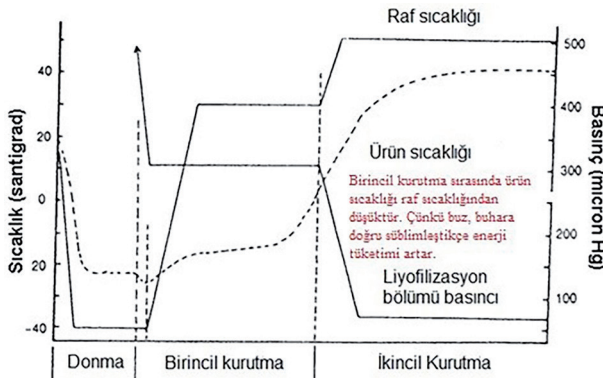
İdeal bir ön dondurmanın gerçekleştirilmesi için, solüsyon içindeki hem çözücü suyun hem çözünen maddenin tamamen kristalleşmesi gerekmektedir [6,14]. Kristalizasyon, dondurma süreci ile kurutulmuş ürünün mikro yapısını oluşturmaktadır. Bunun için dondurulacak ürünün kimyasal yapısına bağlı olarak donma derecesine ulaşılması gerekmektedir. Seçilen dondurma sıcaklığı ve ürünün final sıcaklığı, materyalin kaliteli şekilde kuruma yeteneğini de etkilemektedir [25]. Hızlı soğuma küçük buz kristallerinin oluşmasıyla sonuçlanır ve bu kristaller mikroskobik olarak ne kadar yoğun ise, yapıyı korumada o kadar faydalıdır. Dondurma işlemi ne kadar başarılı gerçekleşirse o kadar iyi kurutulmuş final ürün elde edilir.

Birincil Kurutma: Ürün formülasyonu tamamen donma noktasına ulaştığı anda, liyofilizasyon

cihazı birincil kurutma basamağına geçmektedir. Bu basamağın amacı, liyofilize edilecek ürüne zarar vermeden bağıl nem uzaklaştırmaktır. Liyofilizasyon sistemlerinde daha iyi kurutulmuş ürün elde etmek için sıcaklık ve basınç parametrelerine dikkat edilmelidir [18,19,22,24].

Donmuş üründen buzun süblimleşme (buzun sıvı hale geçmeden uzaklaşması) oranı, buz toplayıcının buhar basıncıyla ürünün buhar basıncı arasındaki farklılığa bağlıdır. Ürün ön dondurma basamağında tamamen kristalizasyon formuna ulaştığında, liyofilizasyon sisteminde basınç azaltılmaktadır. Buhar molekülleri yüksek basınçlı vial içindeki üründen düşük basınçlı ortama göç etmektedir. Yani difüzyon meydana gelmektedir [24,30]. Liyofilizasyon bölümünün basıncının 0.8 mBar'a kadar azalması, örneklerden suyun göç etmesine sebep olmakta ve minimal direnci sağlamak amacıyla örnekler üzerindeki gaz/buhar konsantrasyonunu azaltarak süblimleşme oranını düşürmektedir. Süblimleşme oranı, yaklaşık ayarlanan mBar'a ulaşıncaya kadar artacaktır. Dolayısıyla, azalan sistem basıncı ile süblimleşme oranı artmayacak, çok düşük sistem basıncında beklenen aksine azalacaktır [21,28]. Buhar basıncı ile sıcaklık arasındaki ilişki

liyofilizasyon işlemi sırasında önemli bir etkidir. Bu ilişkinin düzenli yürütmesi, liyofilizasyon sırasında, ürünün sıcaklığı buz toplama sıcaklığından daha fazla olduğu için gereklidir. Liyofilize edilen ürünlerdeki sıcaklık, ürünün dondurulmuş bütünlüğünü devam ettiren sıcaklık ve ürünün buhar basıncını maksimuma çıkaran sıcaklık arasındaki denge açısından son derece önemlidir [2,28]. Bu denge optimum kurutmanın anahtarıdır. Çoğu ürünler ötektik ve cam geçiş noktasında iyi donar. Bu yüzden ürünün sıcaklığı bu kritik sıcaklığın hemen altında ötektik sıcaklık noktasına yükselir ve basıncın azalmasına maruz kalır. Dondurma kurutma süreci de bu noktada başlamaktadır. Dondurarak kurutma sistemlerinde vakum pompası mutlak gereklidir ve ürünün dış çevresinin basıncı daha düşük olarak ayarlanmaktadır (Şekil 2) [14]. Diğer bir olması gereken sistem, donmuş üründen ayrılan nemi toplayan soğuk tuzak (buz toplayıcı) olan toplayıcı sistemdir. Toplayıcı sistem yoğunlaşabilen bütün gazları yoğunlaştırır. Cihazın buhar basıncı, ürünün buhar basıncından daha düşük olduğu için, molekülleri gaz formuna dönüştüren gaz toplayıcıya doğru hareket etmeye meyilli ve doğal afiniteye sahiptirler. Bundan dolayı toplayıcı sıcaklık, ürün sıcaklığından önemli ölçüde daha düşük olmalıdır [19]. Dondurarak kurutma sistemlerinde diğer bir önemli birleşen, enerjidir. Enerji ısı formunda gereklidir. Bir gram suyu donmuş durumundan gaz durumuna doğru süblimleştirebilmek için ihtiyaç duyulan enerji, bir gram suyu dondurmak için ihtiyaç duyulan enerjiden neredeyse 10 kat daha fazladır (buzun her gramı 2700 jul) (Şekil 3).



**Şekil 3.** Liyofilizasyon işlemi sırasında liyofilizasyon basamakları ile ürün arasındaki sıcaklık ve basınç ilişkisi [14].

Primer kurutma sonucunda ürün kek görünümünü almaktadır. İşlem yaklaşık 48 saat sürer ve primer kurutma sonunda ürünün nem oranı % 5-10 arasında olmaktadır [12,23].

İkincil Kurutma: Birincil kurutma işlemi tamamlandıktan sonra, halen pelletin yüzeyine absorbe olmuş su bulunabilmektedir. Ürün kurumuş görünür ama rezidüel nem içeriği, ısıya ve pelleti oluşturan bileşenlerin doğasına bağlı olmakla birlikte %7-8 den daha yüksek olabilir. Ancak çoğu durumda bu nem oranı istenen biyolojik maddelerin stabilitesini koruyabilmesi için çok yüksektir. Bundan dolayı, arzu edilen stabilite, oluşan kek yapısının miktarı ve özelliği değişmeksizin nemin uzaklaştırılması ve dolayısıyla ürünlerdeki nem içeriğinin azaltılmasıyla elde edilmektedir. Bunun için sekonder (ikincil) kurutma basamağına ihtiyaç duyulur [17]. Sekonder kurutmanın amacı, primer kurutma sonrası aşının ve biyolojik/organik materyallerinin dayanıklılığını ve ömrünü arttırmak amacıyla ürünlerdeki bağıl nemin en aza indirilmesidir. Bu süreç, üründen bağıl suyu uzaklaştırdığı için 'İsothermal desorpsiyon' olarak da adlandırılmaktadır [9,20]. Bu rezidüel nemi uzaklaştırma işlemi, genellikle raf sıcaklığını artırarak, ürünün ısısını yükselterek ve şişeler içerisindeki suyun kısmi basıncını azaltarak gerçekleştirilmektedir. Sekonder kurutma sırasında ürende bulunan su, ürüne çok güçlü bağlıdır. Bu yüzden suyun uzaklaştırılması için çok daha fazla enerjiye ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca, primer kurutmanın aksine, sekonder kurutma, toplam süreç zamanının %30-40 teşkil eder ve birincil kurutma basamağında uzaklaştırılan suyun 1/2 ile 1/3 kadarı uzaklaştırılır. Bu basamak sonucunda üründeki nem içeriği % 2 veya daha az miktarlara indirgenmektedir. %2 veya daha az nem oranı çoğu liyofilize ürün için kabul edilebilir bir limittir ve liyofilizasyonun başarısının bir göstergesidir [9,16,27].

### Mikroorganizmaların Liyofilizasyona Yanıtı

Mikroorganizmaların liyofilizasyona duyarlılığı oldukça farklıdır. Genelde bakteriler başarılı bir şekilde liyofilize edilmektedirler. Ancak tür, fizyolojik olarak ne kadar karmaşık hale gelirse liyofilizasyon hasarına duyarlılığı o kadar artmaktadır. Gram pozitif bakteriler ve sporlar birçok farklı formülasyon ile başarılı bir şekilde liyofilize edilebilmektedir. Bunun tersine, Gram negatif bakteri türleri aynı şart-



lar altında daha zayıf bir yaşama oranına sahiptir. Çoğalma şartları da yaşama oranını etkilemektedir. Çoğalmanın logaritmik fazında toplanan bakteriler, sabit fazda toplanan bakterilere göre liyofilizasyona daha duyarlıdır [11,26].

Her ne kadar viruslar yaşayan organizmalar içerisinde fizyolojik olarak en basitleri olsa da, bunların liyofilizasyona yanıtları belirgin derecede çok farklıdır. Greiff ve Rightsel [10], virusların liyofilizasyondan sonra aktivitelerinin korunabilmesi için liyofilizasyon sırasında virusun yapısal ve fonksiyonel organizasyonlarının yanı sıra nükleik asitlerin molekül ağırlıklarının, kapsitin yapısı ve baskın olan protein türünün göz önüne alınması gerektiğini de bildirmişlerdir. Polioviruslarında dahil olduğu Grup VI'nın üyeleri özellikle liyofilizasyona duyarlıdır [25].

Liyofilizasyonda canlı kalan mikroorganizmaların süreç tarafından hasara uğratılma ve kurutma sonrası onarım sırasında mutasyona zorlanması da olası bir durumdur (10). Liyofilizasyon ile oluşabilecek mutasyonların önüne geçmek için, kurutma vasatının içerisine sülfhidril'den zengin bileşiklerin katılmasına ihtiyaç duyulabilmektedir. Ayrıca bazı hassas biyolojik materyaller ise aşırı kurutulduğunda inaktif olabilmektedirler [5,11,26].

## Liyofilizasyon Metotları

### Manifold Metodu

Bu metotta, ampuller, flasklar veya vialler tek tek manifold veya kurutma bölümlerine yerleştirilmektedir. Ürün ne dondurucularda ne de yüzey dondurma ile dondurulmaktadır. Ön dondurulmuş ürün, ısınmayı engellemek için hızlıca kurutma bölümüne yerleştirilmektedir. Ürünün bulunduğu kaplarda vakum hemen oluşturulmalıdır. Bu metot, sadece nispeten küçük volümler ve ötektikli ve çöküş sıcaklıklı ürünler için kullanılabilir [12,13].

### Batch Metodu

Yığın kurutma olarak da adlandırılan bu metot, aynı ölçülerde olan ürünlerin, çok miktarları kurutma tepsilerine beraber yerleştirilmektedir. Ürün, genellikle kurutma tepsilerinin ön rafları üzerinde bir ön dondurma işlemine tabi tutulmaktadır. Gerekli vakum, sıcaklık ve inert gaz ile birlikte aynı ortamda liyofilizasyon işlemi gerçekleştirilmektedir.

Aynı zamanda, bu metot, bütün viallerin kapaklarının aynı anda kapatılmasına olanak sağlamaktadır. Batch kurutma metodu, bir ürüne ait çok sayıda ampül veya viallerin hazırlanmasında ve farmasötik endüstrisinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir [12,13].

### Bulk Kurutma Metodu

Bulk kurutma metodu, batch metodu gibi tepsi kurutularak yapılmaktadır. Ancak bulk ürün tepsi içine tek ürün olarak dökülmekte ve tek ünite olarak kurutulmaktadır. Ürün, rafın tüm yüzeyine yayılmasına ve viallerdeki kurutulmuş ürünlerle aynı incelikte olmasına rağmen, ürün kütlesi içine ısı girişi oranı değişmektedir. Bu metot, yüksek oranda nem ve oksijene hassas olmayan stabil ürünler için kullanılmaktadır [12,13].

### Liyofilizasyonun Avantajları

Liyofilizasyon sırasında ürünün yoğunluğundan kaynaklı olabilecek etkiler en aza indirgenmekte ve kurutulmuş ürün içerisindeki bileşenlerin dağılımı süreç boyunca değişmeden kalmaktadır. Bunun yanı sıra, kurutulmuş ürünlerdeki su içeriği çok düşük seviyelere indirgenmektedir. Bu da ürünün dayanıklılığını arttırmaktadır. Çünkü su içeriği ne kadar düşerse ürünün dayanıklılığı da o kadar artmaktadır. Ayrıca ürün normalde vakum veya inert gaz altında mühürlendiğinden, oksidatif denatürasyon büyük ölçüde azaltılmaktadır. Liyofilizasyonun bir diğer avantajı ise suyun ağırlığının azaltılması ile birlikte ürünün ağırlığı da azalmakta ve bu da ürünün nakli sırasında oluşacak maliyetleri düşürmektedir. İşlem, diğer kurutma tekniklerine göre daha kontrollü çevre şartlarında gerçekleştiğinden kontaminasyon riski azaltılmış olmaktadır. Son olarak, biyolojik ürünlerin depolanmasında ve taşınmasında kolaylık sağlamaktadır [1,14,28].

### Liyofilizasyonun Dezavantajları

Liyofilizasyon sırasında imalat ve işlem süresi uzundur. Bunun yanı sıra ürünün içerisindeki uçucu bileşenlerin (üründe bu bileşenler elzem olabilir) vakumla uzaklaştırılma riski de bulunmaktadır. Ayrıca, liyofilize edilmiş ürünlerin kullanılabilirliği için çoğunlukla steril sulandırıcılara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu da maliyeti artıran faktörlerden biridir [1,18].

## Kaynaklar

1. **Abdelwahed W, Thomas and David E**, (2002). *The Importance of Freezing on Lyophilization Cycle Development*. *Biopharm*. 16-21.
2. **Adams GDJ**, (1994). *Freeze-drying of biohazardous products, in Biosafety in Industrial Biotechnology*. Blackie Academic and Professional, London. 178–212.
3. **Adams GDJ**, (1996). *Lyophilization of vaccines*. In: *Vaccine Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ. 167-185.
4. **Anonim**, (2013). *A Guide to Freeze Drying for the Laboratory*. Erişim: <http://www.pharmaceuticalonline.com/doc/a-guide-to-freeze-drying-for-the-laboratory-0002>. Son erişim tarihi: 05.01.2014.
5. **Arshinova OY, Sanarova EV, Lantsova AV, Oborotova NA**, (2012). *Lyophilization of liposomal drug forms (Review)*. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 46(4), 228-233.
6. **Bahetia A, Kumarb L, Bansal AK**, (2010). *Excipients used in lyophilization of small molecules*. *IPEC-Americas Inc J Excip Food Chem*. 1(1), 46.
7. **Beale PT**, (1983). *Water in biological systems*. *Cryobiology*. 20, 528–531.
8. **Bindschaedler C**, (1999). *Lyophilization process validation*. In: *Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*. Marcel Dekker, New York. 373-408.
9. **Charles P, Detke HC, Pyne A**, (2005). *Post injection delirium/sedation syndrome in patients with schizophrenia treated with Olanzapine longacting injection: analysis of cases*. *BMC psychiatry*.
10. **Grieff D, ve Rightsel, WA**, (1969). *Stabilities of freeze-dried suspensions of influenza virus sealed in vacuum or under different gases*. *Appl. Microbiol*. 17, 830–835.
11. **Griffin CW, Cook FC, ve Mehaffrey MA**, (1981). *Predicting the stability of freeze dried Fusobacterium monstiferum*. *Proficiency testing samples by accelerated storage tests*. *Cryobiology*. 18, 420–425.
12. **Kasper JC, Friess W**, (2011). *The freezing step in lyophilization: physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals*. *Eur J Pharm Biopharm*. 78(2), 248-63.
13. **Khairnar S, Kini R, Harwalkar M, Salunkhe K, Chaudhari SR**, (2013). *A Review on Freeze Drying Process of Pharmaceuticals*. *Int J Res Pharma Sc*. 4(1),76-94.
14. **Kumar GP, Prashanth N, Kumari BC**, (2011). *Fundamentals and Applications of Lyophilization*. *Journal of Advanced Pharmaceutical Research*. 2(4), 157-169.
15. **Kuu WY, Hardwick LM, Akers MJ**, (2006). *Rapid determination of dry layer mass transfer resistance for various pharmaceutical formulations during primary drying using product temperature profiles*. *Int J Pharm*. 313(1-2), 99-113.
16. **Lam T, Strickly RG ve Visor GC**, (2004). *An unexpected pH effect on stability of moexipril lyophilized powder*. *Pharm Res*. 6, 971-975.
17. **Mackenzie AP**, (1966). *Basic principles of freeze-drying for pharmaceuticals*. *Bull. Parenteral Drug Assoc*. 26, 101-129.
18. **Niresha GR, Divya L, Sowmya C, Venkateshan N, Niranjana Babu M, Lavakumar V**, (2013). *Lyophilization/ Freeze Drying - An Review*. *Int J Nov Trends Pharma Sci*. 87-98.
19. **Patel SM, Pikal MJ**, (2013). *Lyophilization process design space*. *J Pharm Sci*. 102(11):3883-7.
20. **Pikal MJ**, (2002). *Heat and Mass Transfer in Low Pressure Gases: Applications to Freeze Drying*. 610-680.
21. **Pikal T, Cannon AJ, Trappier EH**, (2004). *Optimization of lyo cycles and production of mathematical models*. *Eur J Pharm*. 54, 132-154.
22. **Przc DS, Ruzic NLJ, Petrovic SD**, (2004). *Lyophilization –The process and industrial use*. *Chem Ind*. 58(12), 552-562.
23. **Remmele RL, Krishnan S, Callahan WJ**, (2012). *Development of stable lyophilized protein drug products*. *Curr Pharm Biotechnol*. 13(3):471-96.
24. **Rey S, Xialoin T, ve Michael J**. (2004). *Study of optimization of the freeze dried product: practical advice pharmaceutical research*. *Eur J Pharm*. 78- 94.
25. **Rightsel WA ve Grieff D**, (1967). *Freezing and freeze-drying of viruses*. *Cryobiology*. 3, 423–431.
26. **Rudge RH**, (1984). *Maintenance of bacteria by freeze-drying, in Maintenance of Microorganisms*. Academic Press, London. 23–35.
27. **Serigo A, Rambhatla S, ve Pikal MJ**, (2003). *Heat and mass transfer scale-up issues during freeze drying, I: Atypical radiation and the edge vial effect*. *AAPS Pharm Sci Tech*. 4(2), 114-127.
28. **Tang XC ve Pikal MJ**, (2004). *Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: Practical advic. (Review)*. *Pharmaceutical research*. 21(2), 191-200.
29. **Wong JP, Yang H, Nagata L, Kende M, Levy H, Schnell G, Blasetti K**, (1999). *Liposome-mediated immunotherapy against respiratory influenza virus infection using doublestranded RNA poly ICLC*. *Vaccine*. 1788–1795.
30. **Yoshioka S, Aso Y ve Kojima S**, (1999). *The effect of excipients on the molecular mobility of lyophilized formulations, as measured by glass transition temperature and NMR relaxationbased critical mobility temperature*. *Pharm Res*. 135-140.