

**ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ТЕМПЕРАТУРИ ЯК ПАРАМЕТРА ПРОЦЕСУ ЛІОФІЛІЗАЦІЇ****Я. П. Лиса, О. Я. Беспалова**

Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут»

просп. Перемоги, 37, м. Київ-56, Україна, 03056. E-mail: lysaya.yana@gmail.com

Досліджено процес ліофілізації біологічних об'єктів. Розглянуто стадії ліофілізації, вплив температури як параметра процесу на кожній із них, а також шляхи оптимізації. Якість матеріалів, отриманих за допомогою ліофілізації, коливається залежно від умов, в яких вона здійснюється. Саме тому актуальним залишається питання забезпечення оптимальних умов для ліофілізації біологічних об'єктів та їх підтримки шляхом контролю основних параметрів. Розроблено шляхи оптимізації процесу за допомогою підбору та контролю температури. Проаналізовано процес ліофілізації, визначено основні параметри, які впливають на якість ліофілізації біологічних об'єктів. Розглянуто фізичну та принципову схеми процесу ліофілізації, зроблено висновки щодо важливості контролю кожного з етапів процесу. Проведено аналіз методів контролю температури на етапах ліофілізації.

**Ключові слова:** ліофільна сушка, ліофілізація, первинна сушка, вторинна сушка.**ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ КАК ПАРАМЕТРА ПРОЦЕССА ЛИОФИЛИЗАЦИИ****Я. П. Лысая, Е. Я. Беспалова**

Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический институт»

просп. Победы, 37, г. Киев-56, Украина, 03056. E-mail: lysaya.yana@gmail.com

Исследован процесс лиофилизации биологических объектов. Рассмотрены стадии лиофилизации, влияние температуры как параметра процесса на каждой из них, а также методов оптимизации. Качество материалов, полученных с помощью лиофилизации, варьируется в зависимости от условий, в которых она выполняется. Потому актуальным остается вопрос обеспечения оптимальных условий для лиофилизации биологических объектов и их поддержки путем контроля основных параметров. Разработаны методы оптимизации процесса с помощью подбора и контроля температуры. Проанализирован процесс лиофилизации, определены основные параметры, которые влияют на качество лиофилизации биологических объектов. Рассмотрено физическую и принципиальную схемы процесса лиофилизации, сделаны выводы основательно важности контроля каждого из этапов процесса. Проведен анализ методов контроля температуры на этапах лиофилизации.

**Ключевые слова:** лиофильная сушка, лиофилизация, первичная сушка, вторичная сушка.

**АКТУАЛЬНІСТЬ РОБОТИ.** Термін «ліофілізація» визначається як стабілізуючий процес, при якому речовину спочатку заморожують, а потім кількість води в ній поступово знижується за рахунок сублімації (первинна сушка), а потім – за рахунок десорбції (вторинна сушка) до значення, коли біологічний об'єкт не буде підтримувати біологічний ріст та хімічні реакції [1].

Існує декілька назв одного і того ж процесу. Термін «сублімаційна сушка» найбільш часто застосовується у вітчизняній літературі та практиці, однак, він не єдиний. Цей процес також визначають як «молекулярна сушка», виходячи з характеру руху пари в порах продукту і в сушильній камері. У медицині та біотехнології його називають «ліофільна сушка», оскільки в результаті виходять ліофільні, тобто легкорозчинні речовини. У закордонній харчової промисловості часто вживають термін freeze-drying (англ.) [2].

Ще в XIX столітті почали значну увагу приділяти дослідженню мікроорганізмів, проте тривалість зберігання одного біологічного об'єкту була досить короткою, що робило неможливим його детальне вивчення. Були спроби зробити повітряну сушку, проте вони були невдалими – зразок утрачав або свої властивості, або ознаки життєдіяльності.

Почалось вивчення способу зберігання біологічних об'єктів шляхом їх заморожування. Вважалося, що екстремально низькі температури негативно впливають на процеси життєдіяльності досліджува-

ного зразка, проте пізніше виявилось, що більше впливають не низькі температури, а процеси рекристалізації.

1890 року німецький гістолог Альтман першим здійснив висушування тканин при низьких температурах та пониженому тиску. 1905 р. Бенедикт і Менінг заявили, що можуть висушити біологічні об'єкти при низьких температурах за допомогою хімічного насосу на основі етилового ефіру. Необхідність етилового ефіру в камері для витіснення повітря було замінено Шакелем шляхом використання механічних вакуумних насосів. Цікавим є той факт, що ліофільна сушка Шакеля має ті ж самі основні компоненти, що і ліофільні сушки сучасних світових виробників: сушильну камеру, конденсаторну камеру та вакуумні системи [3, 4]. Питання контролю параметрів ліофілізації залишається досі актуальним, оскільки немає досконалої системи контролю температури, тиску та енергії.

Метою роботи є розробка методики оптимізації процесу ліофілізації біологічних об'єктів на основі аналізу температури як параметру процесу.

**МАТЕРІАЛ І РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.** На основі порівняльної характеристики основних параметрів, які впливають на якість вихідного зразка, здійснено аналіз шляхів оптимізації процесу.

Фізичні основи процесу ліофілізації можна проілюструвати за допомогою діаграми рівноваги фаз для води, яка є системою з одним компонентом H<sub>2</sub>O, тому найбільше число фаз, які одночасно можуть

перебувати у рівновазі, дорівнює трьом. Ці три фази – рідина, лід і пара [5].

Число ступенів свободи в цьому випадку дорівнює нулю, тобто не можна змінити ні тиск, ні температуру, щоб не зникла жодна з фаз. Лід, вода і водяна пара можуть існувати в рівновазі одночасно тільки при тиску 0,61 кПа за температури 0,007 °С. Точка співіснування трьох фаз має назву потрійної, або критичної точки (рис. 1). Якщо підвищувати температуру замороженого матеріалу при тиску, нижче тиску потрійної точки води, буде мати місце процес сублімації [6].

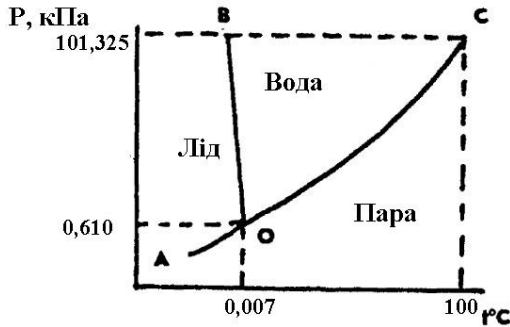


Рисунок 1 – Діаграма рівноваги фаз для води

Ліофілізація застосовується при необхідності тривалого зберігання та консервування різних продуктів біологічного походження, для одержання сухої плазми донорської крові, сухих сироваток і вакцин, у фармацевтичній і харчовій промисловості [7]. У ряді випадків, наприклад, при виробництві сухих легкорозчинних антибіотиків, бактерійних і вірусних препаратів [8], заквасок і ферментів, БАДів і т.п., ліофілізація поки не має альтернативи.

Проте, це дуже складний, трудомісткий процес. Кожен етап повинен контролюватись, до того ж необхідно враховувати усі параметри, які впливають на процес ліофілізації та подальший процент біологічних об'єктів, що вижили.

Температура продукту є одним із найважливіших параметрів, який в подальшому визначає ознаки якості ліофілізованих об'єктів. Серед них зовнішній вигляд, залишкова вологість, стабільність при зберіганні, час відновлення та ін. Однак її неможливо контролювати безпосередньо. На неї впливають такі параметри як температура полиці, тиск у камері, опір продукту, а також попереднє переохолодження та ін. Температура продукту не повинна перевищувати температуру критичної точки на етапі первинної сушки, оскільки це може спричинити колапс або розтавання.

Заморожування є основою для подальшої ліофілізації біологічних об'єктів, оскільки дуже важливим є формування кристалів [9]. По завершенню етапу заморожування основна частина вологи в матеріалі переходить в лід, але при цьому частина зв'язаної води – зазвичай на рівні кількох відсотків, залишається в переохоложеному рідкому стані [10]. На етапі заморожування відбувається фіксація найважливіших властивостей продукту, а подальша сублі-

мація льоду створює пористу структуру. У підсумку якість ліофілізованих продуктів дуже висока, вони легко регідратуються перед подальшим застосуванням [11]. Проте необхідно враховувати індивідуально для кожного біологічного зразка швидкість та температуру заморожування, тривалість, наявність та склад поживних середовищ [12] для підвищення якості вихідного матеріалу.

При повільному заморожуванні живі біологічні об'єкти поступово адаптуються до умов холоду, при чому це запобігає їх склеюванню та руйнуванню. В результаті швидкого заморожування утворюються малі кристали льоду, що допомагає при мікроскопічному дослідженні ліофілізованих біологічних об'єктів, проте ускладнює ліофільне висушування [13]. Температура, при якій заморожуються біологічні об'єкти, впливає на розміри кристалів льоду та пористість. Чим глибше охолодження, тим менші кристали льоду утворюються, проте зменшується і пористість біологічного об'єкту. Збільшення рівня охолодження збільшує і нуклеативну температуру ( $R_p$ ), підвищення якої на кожен градус зменшує час ліофілізації на 3 % [14, 15].

Біологічні продукти заморожуються двома способами, в залежності від складу. Більшість продуктів складаються в основному з води, розчинника, та речовин, розчинених у воді, розчиненої речовини. Ці зразки евентичні і є сумішами, що замерзають при нижчих температурах, ніж вода, яка їх оточує. Коли водяний розчин охолоджений, в матриці продукту виникають зміни концентрації розчиненої речовини. Оскільки процес охолодження продовжується далі, вода, яка оточує розчинену речовину, збільшує її концентрацію. Саме тому тільки коли вся евентична суміш повністю замерзла, вона є замороженою. Ця температура називається евентичною [16].

Другий тип заморожування – заморожування в скляному посуді. Замість формування евентичної суміші суспензії повністю стає все більше і більше в'язкою зі зменшенням температури. Врешті решт об'єкт перетворюється на тверду речовину в певний момент часу [17].

Після заморозки продукту відбувається фаза первинної сушки, в якій умови повинні бути такими, щоб можна було видалити лід за допомогою сублімації, оминаючи рідку фазу (рис. 2). Це вимагає дуже обережного контролю двох параметрів – температури і тиску [18].

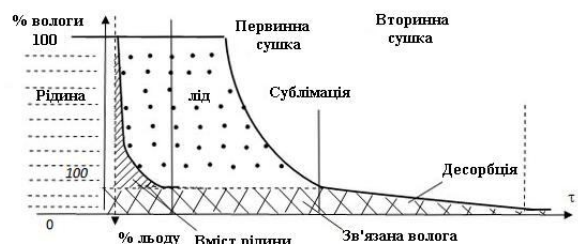


Рисунок 2 – Принципова схема ліофілізації, де  $\tau$  – час

Надзвичайно важливо, щоб температура, при якій проходить ліофілізація, була збалансована між температурою повного замерзання об'єкту та температурою точки максимальної сублімації [19]. Цей баланс є ключовим для оптимальної сушки. Спочатку об'єкт охолоджують до певної температури, а потім поступово піднімають температуру до критичної точки, яка називається потрійною точкою, або критичною точкою. Якщо і далі підвищувати температуру, то лід перетвориться на рідину [20]. Саме тому в даній точці починають знижувати тиск, щоб оминати фазу рідини і перейти у газоподібний стан [21].

Завдяки тиску насиченої пари відбувається сублімація молекул води із замороженого об'єкту до конденсора [22]. Молекули мають природну здатність рухатись до колектора, оскільки він має нижчий тиск насиченої пари, ніж дослідний об'єкт. До того ж температура колектора повинна бути значно нижчою від температури об'єкта. Підвищення температури об'єкта має більший вплив на різницю тиску насиченої пари, ніж зниження температури конденсора.

Компонентом, незамінним у системі ліофільної сушки, є енергія у формі нагрівання. Майже в десять разів більше енергії потрібно, щоб сублімувати 1 г води із замороженого продукту порівняно із заморожуванням 1 г води [23]. Ось чому необхідно підвищувати температуру об'єкта для підтримки сублімації водяної пари із замороженого продукту. Підігрів повинен дуже обережно контролюватись, оскільки підвищення температури вище температури сублімації, може підвищити температуру продукту вище евтенічної або температури потрійної точки. Існує два способи підвищення температури. Перший метод – це підігрів полиць, на яких знаходиться об'єкт. Іншим метод – це підігрів усієї камери. Планується провести досліді з використанням обох способів та перевірити, який найбільш придатний для умов лабораторії.

На кожному етапі ліофілізації змінюється фізичний стан дослідного зразка. На етапі заморожування більша частина рідини перетворюється в лід, при цьому увесь матеріал ділиться на два шари: лід та рідину, яка не перетворилась на лід. На стадії первинної сушки матеріал розділяється на три шари: лід, матеріал, в якому відбулась часткова сублімація, та водяна пара (рис. 3).

На етапі вторинної сушки дослідний зразок розділяється на дві частини: ліофілізований продукт і частина, яка містить залишкову вологу. На даній стадії поділ є умовним, оскільки неможливо чітко виділити межі шарів. Отже, на кожному етапі необхідно враховувати фізичний стан та температуру кожного шару біологічного матеріалу та чітко контролювати її рівень та тривалість процесу.

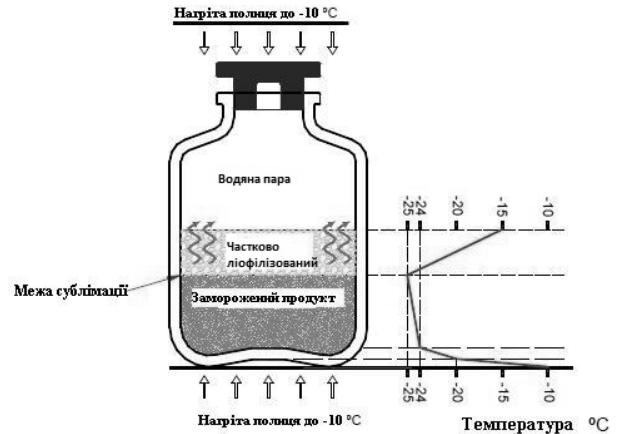


Рисунок 3 – Рух мас на етапі первинної сушки

Завдяки великій тривалості етапу первинної сушки, енергоємності та можливості пошкодження біологічного об'єкта дуже важливим є моніторинг [11] та контроль температури [24].

Дуже часто використовується термоелемент, який поміщується в декілька флаконів для вимірювання температури продукту під час процесу.

Проте, даний метод має ряд недоліків:

- інвазивність (елемент вводиться прямо у флакон);
- вплив утворення льоду та сублімації на результат;
- проблеми, пов'язані зі стерильністю продукту;
- можливість вимірювання температури лише в одній точці.

Новітні розробки дозволяють використовувати «Розумні флакони» [25], які мають ряд переваг:

- вимірювання внутрішньої температури (продукту), зовнішньої температури (в камері) та температури полиці;
- неінвазивне вимірювання.

Також набуває поширення метод вимірювання температури за допомогою бездротових датчиків, вбудованих в кришку флакона. Даний спосіб вирішує питання безперервного довготривалого контролю та можливості бездротової передачі отриманих даних на монітор. Проте питання інвазивності та стерильності продукту залишається відкритим.

Існує метод вимірювання температури за допомогою ближнього інфрачервоного світла [26].

Основним недоліком цього методу є те, що вимірювання температури можливо тільки через 50–100 хв. після початку роботи, коли лід почав сублімуватись.

Після первинної сушки увесь лід сублімується, проте залишається зв'язана волога у дослідному зразку. Здається, що продукт уже висушений, але вміст залишкової вологи може бути в межах 7–8 % [27]. На етапі вторинної сушки важливо продовжувати висушування при підвищеній температурі [28], щоб зменшити вміст залишкової вологи до оптимальних об'ємів [29]. Цей процес називається ізотермальною десорбцією, оскільки зв'язана волога десорбується з продукту.

Вторинна сушка зазвичай проходить, коли температура дослідного зразка, вища, ніж температура оточуючого середовища, але сумісна з чутливістю продукту [30]. Всі інші умови, такі як тиск та температура конденсора, залишаються без змін. Оскільки відбувається десорбція, вакуум повинен бути настільки низьким, наскільки можливо, та температура конденсора настільки низькою, наскільки можливо. Етап вторинної сушки зазвичай займає від 1/3 до 1/2 часу порівняно з часом, який займає первинна сушка [31].

Отже, в процесі вторинної сушки обов'язково необхідно контролювати:

- сталість залишкової вологи після майже 6-годинної роботи за підвищеної температури;
- температуру об'єкта, яка повинна бути вище температури навколишнього середовища.

За високої температури та низької залишкової вологи неможливо нашкодити біологічному об'єкту, який піддається ліофілізації.

ВИСНОВКИ. У результаті досліджень доведено, що технологія ліофілізації має низку переваг:

- максимальний ступінь збереження (до 90 %) поряд з малою питомою вагою близько (1/5–1/10 ваги неліофілізованих речовин), що дозволяє запобігти розкладанню та дегенерації біологічного об'єкта, найбільш оптимальна для продуктів з високою чутливістю та високим ступенем окиснення;
- низький процент вмісту вологи, і як наслідок, формування комірчастої структури продукту, який матиме неперевершені властивості швидкого розчинення та регідратації, а також відновлення властивостей при додаванні води. Тому ліофілізація оптимально підходить для швидкокорозчинних лікарських препаратів, а також продуктів, призначених для тривалого зберігання в нерегульованих температурних умовах;
- завдяки герметичності приладу виключається можливість забруднення об'єкта чужорідною мікрофлорою.

Проте, для досягнення основних цілей ліофілізації біологічних об'єктів необхідно чітко контролювати усі етапи процесу: попереднє заморожування, первинну сушку та вторинну сушку.

Температура об'єкта є одним з найважливіших параметрів ліофілізації. Дане питання залишається актуальним, саме тому подальші дослідження будуть спрямовані на оптимізацію процесу шляхом підвищення якості контролю параметрів процесу, зокрема температури.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Harris R.J.C., Ed. Biological Applications of Freezing and Drying. – New York: Academic Press, 1954.
2. Исследование процесса сублимационного обезвоживания жидких материалов с многократным использованием теплоты фазовых переходов / С.Т. Антипов, Г.И. Мосолов, М.Н. Сидоров // Межд. научно-техн. конф. «Прогрессивные технологии и оборудование для пищевой промышленности»: тез. докл. – Воронеж, 1997. – С. 155–158.

3. Jennings T. A. Lyophilization: introduction and basic principles. – Englewood. CO: Interpharm Press, 1999. – P. 624.

4. Patent US 6543155 B2. Freeze-dried product and process and apparatus for producing it / Horigane A.; assignee National Agricultural Research Organization. – Filed 20.09.2002; date of patent 08.04.2003.

5. Alexeenko A. Fluid Dynamic Modeling of Lyo technology: Qualifying and Reshaping the Design Space. Presented at the International Society of Lyophilisation – Freeze Drying (ISLFD) Mid-West Chapter Meeting. – Chicago, USA, 2012.

6. Вакуум-сублимационная сушка пищевых продуктов (Основы теории, расчет и оптимизация) / Б.П. Камовников, Л.С. Малков, В.А. Воскобойников. – М.: Агропромиздат, 1985. – 288 с.

7. European Patent Application 92202581.1. Continuous freeze-drying apparatus/ Bruttini R. – Date of filing 20.11.1992; date of publication 16.06.1993, Bulletin 93/24.

8. Patent US 4295132. Lyophilization of bacteria / Sandine William E., Vedamuthu Ebenezer R.; assignee MicroLife Technics, Inc. – Filed 17.07.1978; date of patent 27.05.1980.

9. Solid-liquid state diagram of the water-glycine-sucrose system / E.Yu. Shalav, A.N. Kanev // Gryobiology. – 1994. – Vol. 31. – P. 374.

10. Семенов Г.В. Модель и аналитическое описание процесса сублимационной сушки полидисперсных материалов // Вестник Международной академии холода. – 2003. – Вып. 2. – С. 37–41.

11. Ozkavukcu S. Cryopreservation: Basic knowledge and biophysical effects// Journal of Ankara medical school. – 2002. – Vol. 24. – № 4. – PP. 187–196.

12. Rowe T.W.G. Freeze-drying of biological materials: some physical and engineering aspects // Current Trends in Cryobiology. – 1970. – PP. 61–138.

13. Van Wagtenonk-De Leeuw A.M., Den Daas J.H.G., Kruip T.A.M., Rall W.F. Comparison of the efficacy of conventional slow freezing and rapid cryopreservation methods for bovine embryos // Cryobiology. – 1995. – Vol. 32. – PP. 157–167.

14. The importance of freezing on Lyophilization cycle development / Patapoff Thomas W., Overcashier David E. – BioPharm. – 2002. – Vol. 2. – PP. 16–21.

15. Shon M. Understanding & Optimizing the Freeze Drying Cycle Utilizing SMART™ & CONTROLLO™ Nucleation On-demand Technology. Presented at the International Society of Lyophilisation – Freeze Drying (ISLFD) Mid-West Chapter Meeting. Chicago, USA, 2012.

16. Han B., Bischof J.C. Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing // Cryobiology. – 2004. – Vol. 48. – PP. 8–21.

17. The Collapse Temperature in freeze drying: Dependence on Measurement methodology and rate of water removal from the glassy phase / Pikal M., Shah S. // Journal Pharmaceutical Science. – 1990. – Vol. 62. – PP. 165–186.

18. Patent US 6848196 B2. Method of monitoring a freeze-drying process / Brulls M.; assignee Astra

Zeneca A.B. – Filed 17.04.2001; date of patent 01.02.2005.

19. Теплообмен в промышленных процессах вакуумного сублимационного обезвоживания с учетом условий контактирования / Г.В. Семенов, М.С. Булкин, Л.Э. Меламед, А.И. Тропкина // Вестник международной академии холода. – 2010. – Вып. 2. – С. 25–33.

20. Freeze-drying of red blood cells at ultra-low temperatures / Rindler V., Luneberger S., Schwindke P. et al. – Cryobiology. – 1999. – Vol. 38. – PP. 2–15.

21. Теплометрические основы оптимизации параметров сублимационной сушки в вакууме / Д.П. Лебедев, О.А. Геращенко, Е.Ф. Андреев // ИФЖ. – 1973. – Т. 24, № 6. – С. 1059–1064.

22. Barbaree J.M. and A. Sanchez. Cross-contamination during lyophilization // Cryobiology. – 1982. – Vol. 19. – PP. 443–447.

23. European Patent Application 1903291A1. Method and system for controlling freeze-drying process/ Velardi S., Barresi A. – Date of filling 19.09.2006; date of publication 26.03.2008, Bulletin 2008/13.

24. Barresi A. Monitoring of the primary drying of a lyophilization process in vials // Barresi A, Pisano R, Fissore D, et al. – Chem Eng Process. – 2009. – Vol. 48. – PP. 408–423.

25. Gieseler, H.; Kramer, T.; Pikal, M. 2005. Use of manometric temperature measurement (MTM) and SMART freeze dryer technology for development of an optimized freeze drying cycle / Gieseler H., Kramer T., Pikal M. – PDA Journal of Pharmaceutical Science and

Technology. – 2005. – Vol. 96 (12). – PP. 3402–3418.

26. Hafeez Y.M. Effect of freeze-drying and gamma irradiation on biomechanical properties of bovine pericardium// Cell and Tissue Banking. – 2005. – Vol. 6. – PP. 85–89.

27. Determination of the End Point of Primary Drying in Freeze-Drying Process Control / Patel S., Doen T., Pikal M. // AAPS PharmSciTech. – 2010. – Vol. 11(1). – PP. 73–84.

28. Nail S. The effect of chamber pressure on heat transfer in the freeze-drying of parental solutions// Journal of the Parental Drug Association. – 1980. – Vol. 34. – PP. 358–368.

29. Willemer H. Measurement of temperature, ice evaporation rates and residual moisture contents in freeze-drying // Dev. Biol. Stand. – 1991. – Vol. 74. – PP. 123–136.

30. Теория и практика криогенного и сублимационного консервирования / Н.С. Пушкарь, А.М. Белоус, У.Д. Цветков. – К: Наукова думка, 1984. – 264 с.

31. Nail S. A design Space Approach to Freeze Dry Cycle Development and Optimization. Presented at the International Society of Lyophilisation. – Freeze Drying (ISLFD) Mid-West Chapter Meeting. Chicago, USA, 2012.

## THE IMPACT STUDY OF TEMPERATURE AS A FREEZE-DRYING PROCESS PARAMETER

**Yana Lysa, Olena Bepalova**

National Technical University of Ukraine "Kyiv Polytechnic Institute"  
prosp. Peremogy 37, Kiev 03056, Ukraine. E-mail: lysaya.yana@gmail.com

In this article, the authors have considered study of freeze-drying of biological objects. The paper discusses the lyophilization stages, the effect of temperature as a parameter of the process on each of them, and also optimization techniques. The quality of the materials obtained by lyophilization varies depending on the executed conditions. Therefore, the question remains – to ensure the optimal conditions for freeze-drying of biological objects and their support via control of the key parameters. The aim is to develop the methods for the process optimization through selection and temperature control. The authors have analyzed the freeze-drying process and the key parameters that affect the quality of freeze-drying of biological objects. Physical and concept schemes of the lyophilization process were examined, and conclusions about the importance of control of each stage of the process were formulated. Also, the methods of temperature control at the freeze-drying stages have been analyzed. The research results will be used for the process modeling and optimization.

**Key words:** freeze-drying, lyophilization, primary drying, secondary drying.

### REFERENCES

1. Harris, R.J.C. (1954), *Biological Applications of Freezing and Drying*, Academic Press, New York, USA.

2. Antipov, S.T., Mosolov, G.I., Sidorov, M.N. (1997), "Investigation of liquids' sublimation dehydration with multiple use of heat of the phase transitions", *Proc. of Int. Sci. Conf. Advanced technologies and equipment for the food industry*, Voronezh, Russia, pp. 155–158.

3. Jennings, T.A. (1999), *Lyophilization: introduction and basic principles*, Interpharm Press, Englewood

CO, USA.

4. Patent US 6543155 B2. Freeze-dried product and process and apparatus for producing it / Horigane A.; assignee National Agricultural Research Organization. – Filed 20.09.2002; date of patent 08.04.2003.

5. Alexeenko, A. (2012), "Fluid Dynamic Modeling of Lyo technology: Qualifying and Reshaping the Design Space", *The International Society of Lyophilisation – Freeze Drying (ISLFD) Mid-West Chapter Meeting*, Chicago, USA.

6. Kamovnikov, B.P., Malkov, L.S., Voskobonnikov, V.A. (1985), *Vakuim-sublimatechnaya sushka*

*pischevykh produktov* [Vacuum freeze-drying of food products (basic theory, calculation and optimization)], Agropromizdat, Moscow, Russia.

7. European Patent Application 92202581.1. Continuous freeze-drying apparatus/ Bruttini R. – Date of filling 20.11.1992; date of publication 16.06.1993, Bulletin 93/24.

8. Patent US 4295132. Lyophilization of bacteria / Sandine William E., Vedamuthu Ebenezer R.; assignee Microlife Technics, Inc. – Filed 17.07.1978; date of patent 27.05.1980.

9. Shalav, E.Yu., Kanev A.N. (1994), “Solid-liquid state diagram of the water-glycine-sucrose system”, *Cryobiology*, vol. 31, p. 374.

10. Semenov, G.V. (2003), “The model and the analytical description of the freeze drying process of poly-disperse materials”, *Vestnik mezhdunarodnoi akademii holoda*, vol. 2, pp. 37–41.

11. Ozkavukcu, S. (2002), “Cryopreservation: Basic knowledge and biophysical effects”, *Journal of Ankara medical school*, vol. 24, no. 4, pp. 187–196.

12. Rowe, T.W.G. (1970), “Freeze-drying of biological materials: some physical and engineering aspects”, *Current Trends in Cryobiology*, pp. 61–138.

13. Van Wagtenonk-De Leeuw AM, Den Daas JHG, Kruip TAM, Rall WF (1995), “Comparison of the efficacy of conventional slow freezing and rapid cryopreservation methods for bovine embryos”, *Cryobiology*, vol. 32, pp. 157–167.

14. Patapoff, Thomas W., Overcashier David E. (2002), *The importance of freezing on Lyophilization cycle development*, BioPharm, vol. 2, pp. 16–21.

15. Shon, M. (2012), “Understanding & Optimizing the Freeze Drying Cycle Utilizing SMART™ & CONTROLLYO™ Nucleation On-demand Technology”, *The International Society of Lyophilisation – Freeze Drying (ISLFD) Mid-West Chapter Meeting*, Chicago, USA.

16. Han, B., Bischof, J.C. (2004), “Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing”, *Cryobiology*, vol. 48, pp. 8–21.

17. Pikal, M., Shah, S. (1990), “The Collapse Temperature in freeze drying: Dependence on Measurement methodology and rate of water removal from the glassy phase”, *Journal of Pharmaceutical Science*, vol. 62, pp. 165–186.

18. Patent US 6848196 B2. Method of monitoring a freeze-drying process / Brulls M.; assignee AstraZeneca AB. – Filed 17.04.2001; date of patent 01.02.2005.

19. Semenov, G.V., Bulkin, M.S., Melamed, L.E., Tropkina, A.I. (2010), “Heat and mass transfer in industrial processes of vacuum sublimation dehydration, taking

into account the contact conditions”, *Vestnik mezhdunarodnoi akademii holoda*, vol. 2, pp. 25–33.

20. Rindler, V., Luneberger S., Schwindke P., et al. (1999), “Freeze-drying of red blood cells at ultra-low temperatures”, *Cryobiology*, vol.38, pp. 2–15.

21. Lebedev, D.P., Gerashchenko, O.A., Andreev E.F. (1973), “Heat metric foundations of parameters optimization of freeze drying in vacuum”, *Journal of Engineering Physics and Thermophysics*, vol. 24, no 6. pp. 1059–1064.

22. Barbaree, J.M., Sanchez A. (1982), “Cross-contamination during lyophilization”, *Cryobiology*, vol. 19, pp. 443–447.

23. European Patent Application 1903291A1. Method and system for controlling freeze-drying process/ Velardi S., Barresi A. – Date of filling 19.09.2006; date of publication 26.03.2008, Bulletin 2008/13.

24. Barresi A. Pisano R, Fissore D, et al. (2009), “Monitoring of the primary drying of a lyophilization process in vials”, *Chem Eng Process*, vol. 48, pp. 408–423.

25. Gieseler, H., Kramer T., Pikal M. (2005), “Use of manometric temperature measurement (MTM) and SMART freeze dryer technology for development of an optimized freeze drying cycle”, *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, vol. 96(12), pp. 3402–3418.

26. Hafeez, Y.M. (2005), “Effect of freeze-drying and gamma irradiation on biomechanical properties of bovine pericardium”, *Cell and Tissue Banking*, vol. 6, pp. 85–89.

27. Patel, S., Doen T., Pikal, M. (2010), “Determination of the End Point of Primary Drying in Freeze-Drying Process Control”, *AAPS PharmSciTech*, vol. 11(1), pp. 73–84.

28. Nail, S. (1980), “The effect of chamber pressure on heat transfer in the freeze-drying of parental solutions”, *Journal of the Parental Drug Association*, vol. 34, pp. 358–368.

29. Willemer, H. (1991) “Measurement of temperature, ice evaporation rates and residual moisture contents in freeze-drying”, *Dev. Biol. Stand.*, vol. 74, pp. 123–136.

30. Pushkar, N.S., Belous A.M., Tsvetkov U.D. (1984), *Teoriya i praktika kriogennoho i sublimatsionnoho konservirovaniya* [Theory and practice of sublimation and cryogenic preservation], Naukova dumka, Kyiv, Ukraine.

31. Nail, S. (2012), “A design Space Approach to Freeze Dry Cycle Development and Optimization”, *The International Society of Lyophilisation. – Freeze Drying (ISLFD) Mid-West Chapter Meeting*, Chicago, USA.

Стаття надійшла 20.08.2013.