




Demir, Potasyum, Magnezyum ve Sodyum Tuzlarını İçeren Mannitol Çözeltilerinin Liyofilizasyon Esnasında Kritik Formülasyon Sıcaklıklarının Differensiyel Termal Analiz (DTA) Cihazı ve Freeze Dry Mikroskop (FDM) ile Belirlenmesi

Gülseren YILDIZ ÖZ

Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, İstanbul

 Yıldız Oz G 0000-0003-1201-4920

*Corresponding Author's E-Mail: gulseren.yildiz@tarimorman.gov.tr

Özet

Bir maddenin kinetik saatinin yavaşlatıldığı liyofilizasyon süreci, her madde veya çözelti için özel olmaktadır. Her maddenin kendisine özel bazı önemli hal değişim sıcaklıkları bulunmaktadır. Ötektik nokta (Teu), camı geçiş sıcaklığı (Tg) ve çökme sıcaklığının (Tc) belirlenmesi maddenin tanımlanabilmesi ve kaliteli kuruma için reçete hazırlanmasında gerekli olmaktadır. Mannitol ve farklı mineral tuzlarını içeren çözeltilerin kurutma reçetelerini oluşturmak için gerekli olan kritik sıcaklık değerlerini belirlenmesi bu çalışmanın amacını oluşturmaktadır. Bu amaçla demir, potasyum, magnezyum ve sodyum tuzlarını içeren mannitol çözeltilerinin kritik formülasyon sıcaklıkları, Differansiyel Termal Analiz (DTA) cihazı ve Freeze Dry Mikroskop (FDM) kullanılarak belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda mannitolün Teu ve Tc değerleri yüksek bulunmuştur. Ayrıca tuzların Teu ve Tc değerlerini düşürdüğü sonucuna varılmıştır. Mannitol için elde edilen Teu ve Tc değerleri liyofilizasyonu kalitesi açısından başarılı bir sonucu ifade etmektedir. Mannitol çözeltisine eklenen tuzlar ise primer kurutmanın daha düşük sıcaklıklarda bitirilmesini gerektirmektedir. Bu sonuç zor ve daha masraflı bir primer kurutma prosesini ifade etmektedir.

Received 02 April 2020
Accepted 15 December 2020
Published 30 December 2020

Anahtar Kelimeler:
Liyofilizasyon, Mannitol, Mineral Tuzları

Cite this article: Yıldız Öz G (2020) Demir, Potasyum, Magnezyum ve Sodyum Tuzlarını İçeren Mannitol Çözeltilerinin Liyofilizasyon Esnasında Kritik Formülasyon Sıcaklıklarının Differensiyel Termal Analiz (DTA) Cihazı ve Freeze Dry Mikroskop (FDM) ile Belirlenmesi. Turk Vet J, 2(2):39-44.

Determination of Critical Formulation Temperatures of Mannitol Solutions Containing Iron, Potassium, Magnesium and Sodium Salts by Differential Thermal Analysis (DTA) and Freeze Dry Microscope (FDM)

Abstract

The lyophilization process, in which the kinetic clock of a substance is slowed, is specific for each substance or solution. There are some important state-change temperatures specific to each substance. It is necessary to determine the collapse temperature (Tc), eutectic point (Teu) and glass transition (Tg), to prepare a prescription for quality drying and to define the material. The aim of the study is to determine the critical temperature values required to form drying recipes of solutions containing mannitol and different mineral salts. For this purpose, critical formulation temperatures of mannitol solutions containing iron, potassium, magnesium and sodium salts were determined using Differential Thermal Analysis (DTA) device and Freeze Dry Microscope (FDM). At the end of the study, Teu and Tc values of mannitol were found to be high. Also, it was concluded that salts reduce Teu and Tc values. The Teu and Tc values obtained for mannitol represent a successful result in terms of lyophilization quality. Salts added to the mannitol solution require primary drying to be completed at lower temperatures. This result represents a difficult and costly primary drying process.

Keywords: Lyophilization, Mannitol, Mineral Salts

Giriş

Modern teknolojinin gelişmesi ile birlikte biyolojik ve kimyasal maddelerin stabil ve canlı halde kalması liyofilizasyon teknolojisi ile mümkün kılınabilmektedir (Pikal, 2001). Mannitol liyofilizasyon prosesinde koruyucu olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Liyofilizasyon sırasında

donma süreci en önemli basamak olarak görüldüğünden bir molekülün nasıl donduğu araştırma konusu olmaktadır (Kasper ve Friess, 2011). Donmuş mannitol solüsyonu çoğunlukla kristal yapılıdır ve içerisinde bulunan tampon bileşenlerin (liyoprotektanlar veya proteinler gibi) varlığı mannitol kristalleşmesini inhibe veya teşvik

edebilmektedir (Lueckel ve ark., 1998). Özellikle izotoniklik ajanı veya stabilizatör amaçlı eklenen tuzlar, mannitol ve diğer yardımcı maddelerin fiziko-kimyasal özellikleri üzerinde büyük bir etkiye sahiptir (Shalaeve ve Franks, 1996; Telang ve ark., 2003). Mannitol liyofilizasyondan sonra metastabil bir kristalin hidrat formuna dönüşebilmektedir. Manntiolün hidrat yapısının bozulması ile yapıdan su salınımı gerçekleşir ve nihai ürünün nem oranı artar. Nem oranının artışı ise stabilitenin bozulması neticesinde ürünün raf ömrünü azaltır (Yu ve ark., 1999). Amorf formda mannitol aktif ürünü moleküler etkileşimlerle stabilize edebilmektedir (Izutsu ve ark., 1994). Tuzların ise dondurma, tavlama ve kurutma sırasında formülasyonun fiziko-kimyasal özellikleri üzerindeki etkileri araştırılmaktadır (Hawe ve Frieß., 2006).

Bir maddenin kristal veya amorf yapıya sahip olması bu yapıların termal özelliklerinin bilinmesi açısından önemli olmaktadır. Maddelerin yapısına göre kritik formülasyon sıcaklıkları değişebilmekte ve liyofilizasyon reçetesinin optimize edilmesi gerekebilmektedir (Patel ve Hurtwitz, 1972). Kristal maddeler için kristalizasyon ve erime sıcaklığı, amorf maddeler için ise camsı geçiş sıcaklıklarının belirlendiği kritik noktalar numune ve referans malzeme arasındaki sıcaklık farkı ölçümüne dayalı bir metot kullanılarak (Differensiyel Termal Analiz-DTA) belirlenebilmektedir (Martin ve ark., 2007). Freze Dry Mikroskop (FDM) ile liyofilizasyonun ince bir film gibi ön incelemesinin yapılarak sıcaklık artışı ve basınç altında maddelerin çökme sıcaklığı belirlenmektedir (Arshad ve ark., 2014). Çözeltilerin içerisinde bulunan tuzların dezavantajı kritik formülasyon sıcaklıklarını düşürmesiyken, matriks olarak sağlam bir iskelet oluşturması tuzların avantajı olmaktadır (Hawe ve Frieß, 2006). Kristal yapı içerisinde bulunan su buharlaşırken canlı hücrelerin hücre duvarına zarar verdiği için oluşan kuruma kaliteli olamamakta ve rekonstrüksiyon sırasında canlılık kayıpları oluşabilmektedir (Day ve Stacey, 2007). Matriks olarak amorf maddelerin kullanılması canlı hücrelerin güvenliği açısından avantaj iken, amorf yapılar arasından bağlı suyun uzaklaştırılmasının çok zor olması dez avantaj olabilmektedir (Rey, 1960). Mannitol çözelti kompozisyonuna göre amorf ya da kristal gibi davranabilmektedir. Bu özelliğinden dolayı liyofilizasyonda kriyoprotektan olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Izutsu ve ark., 1994). Tuz varlığı ise mannitolün kristalleşmesini kritik sıcaklıklarda inhibe edebilmekte veya kritik sıcaklık değerlerini değiştirebilmektedir (Telang ve ark., 2003). Bu nedenle sunulan çalışmada mannitol çözeltisine

eklenen farklı tuzların donma sürecinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çözeltilerin kritik formülasyon sıcaklıklarını belirlemek için FDM ve DTA cihazları kullanılmıştır. Bu sayede çalışmada kullanılan farklı tuzların liyofilizasyon esnasında mannitolün primer kurutmasına etkileri incelenmiştir. Ayrıca daha verimli bir nihai ürün elde etmek için primer kurutmanın daha yüksek sıcaklıklarda bittiği mannitol-tuz çözeltisi belirlenmeye çalışılmıştır.

Materyal ve Metot

Materyal

Bu çalışmada materyal olarak D-Mannitol (cas no: 69-65-8) kullanılmıştır. Mannitol ile tuzlu çözeltiler hazırlanmıştır; tuz olarak Sodyum klorür (NaCl) (cas no: 7647-14-5), Potasyum klorür (KCl) (cas no: 7447-40-7), Demir klorür (FeCl₃) (cas no: 7705-08-0) ve Magnezyum klorür (MgCl₂) (cas no: 7786-30-3) kullanılmıştır.

Kritik formülasyon sıcaklıklarının belirlenmesi için DTA (Lyotherm2, Biopharma Tch. Ltd, UK) ve FDM (Lyostat2, Biopharma Tch. Ltd, UK) cihazları kullanılmıştır.

Metot

Tuz içeren Mannitol Çözeltilerinin Hazırlanması
Saf mannitol ve 0,1/1 oranında NaCl, KCl, FeCl₃, MgCl₂ içeren olmak üzere beş farklı mannitol çözeltisi hazırlanmıştır.

DTA analizi

DTA analizi için alüminyum blok içerisinde bulunan üç adet kuyucuğa referans solüsyon ve numuneler 3 ml olarak doldurulmuştur. Hazırlanan NaCl, KCl, FeCl₃ ve MgCl₂ içeren Mannitol çözeltileri ayrı ayrı cihaza yüklenmiştir. Çözelti hazırlanırken kullanılan distile su DTA cihazında referans madde olarak kullanılmıştır. Sonrasında kuyucuklara örnek, referans ve impedans için 3 adet ve alüminyum blok için 1 adet olmak üzere 4 adet prob yerleştirilmiştir. Alüminyum blok hazneye yerleştirilmeden önce, haznenin 1/3' ü sıvı azot ile doldurulmuştur. Cihazda yer alan ısı geçirgen bloğun ısı tank içerisinde sıvı azot yardımı ile başlangıçta -100 °C'ye kadar düşürülmüştür. Tüm problemler 0°C'yi gösterene kadar ısıtma işlemine devam edilmiştir. Sonrasında aktivasyon ile blok ısınmaya başladığında, moleküler hareketlilik başlayana kadarki statik durum monitördeki programda taban çizgisi olarak gözlenmiştir. Cihaz dosyasından ham veriler excel dosyasına aktarılmıştır. DTA eğrisinde, numunenin endotermik değişiminden kaynaklanan sıcaklık

farkları negatif yönde, ekzotermik değişimden kaynaklanan sıcaklık farkları ise pozitif yöndeki sapma olarak değerlendirilmiştir (Andrade ve ark., 2018).

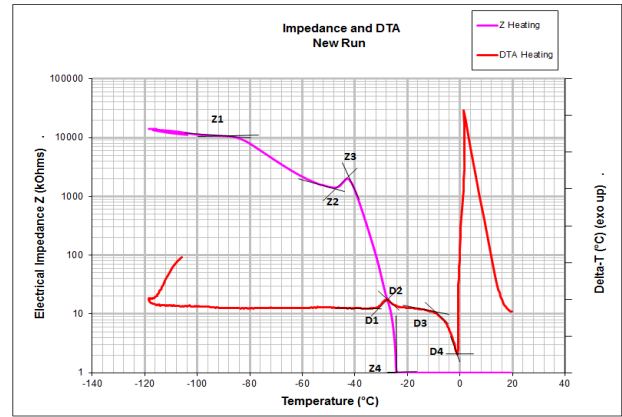
FDM analizi

FDM donmuş materyalin yapısını mikroskop altında incelemeye izin vermektedir. Çalışma sırasında 16-20 mm çapında quartz lam, mikroskop altına gümüş blok üzerine yerleştirilmiştir. Mikroskopun lamına 2 µl kadar materyal damlatılarak üzerine önce 70 µ yüksekliğinde alüminyum spacer ve sonra 13 mm çapında cam lamel kapatılmıştır. Vakum ve sıcaklık kontrol altında tutularak liyofilizasyon prosesi başlatılmıştır. İlk olarak 20 °C/dk'lık soğutma ivmesi ile ürün sıcaklığının -60 °C'ye soğuması sağlanmıştır. Sonrasında vakum pompası devreye sokularak donmuş ürünün kuruma prosesi başlatılmıştır. Ürün vakum altında sıcaklık dakikada 1°C düşürülerek ısıtılmış ve bu süre boyunca her 10 saniyede mikroskopta elde edilen görüntü kayıt altına alınmıştır. Bu görüntülerde süblimizasyon ara yüzeyinde oluşan değişiklikler gözlemlenmiş ve yapıda bozulmaya sebep olan sıcaklık dereceleri kayıt altına alınmıştır. Böylece her çözelti için liyofilizasyon prosesi incelenmiş ve karşılaştırılmıştır (Meister ve Gieseler, 2009).

Bulgular

Diferansiyel termal analiz işlemi sonunda elde edilen impedans ve DTA eğrileri Şekil.1 de gösterilmektedir. Şekil üzerinde mor renkte gösterilen impedans eğrisi üzerinde belirlenen Z1 noktası maddelerin yapısında meydana gelen stabilizasyonun ve kararsızlığın başladığı nokta olarak değerlendirilmektedir. Bu sıcaklıkta bu çizgide meydana gelen negatif sapma liyofilizasyon prosesini etkilememektedir. Z2 noktasında meydana gelen yeniden kristalleşmenin ardından Z3 noktasında yapıda yumuşama başlamakta ve bu sıcaklığın üzerinde yapı hızla bozulmaktadır. Bu sıcaklık değeri liyofilizasyon için önemlidir ve kritik

formülasyon sıcaklıklarından birini tanımlamaktadır. Buz kristallerinin hareketlilik ve füzyonu ile ilişkili olarak asgari empedans değeri Z4 olarak gösterilmektedir. Kırmızı olarak gösterilen DTA eğrisi üzerinde işaretli D1 noktası kristalizasyon başlangıcı olarak değerlendirilmiştir. DTA'da elde edilen düz çizgiden (base line) ilk sapmanın başladığı sıcaklık bulunarak maddenin kararlı olduğu sıcaklık limiti belirlenmiştir. D2 de kristalizasyonun inhibisyonu gözlenmiş, D3 de termal erime başlangıcı belirlenmiştir. Aynı zamanda D3, DTA grafiğinde donmuş matrisin dengesizleşmesiyle ilgili olayların göstergesi olan endotermik bir patern başladığını göstermektedir. DTA'daki D4 noktasındaki keskinlik erimeyi ve D3 ile başlatılan mükemmel tanımlanmış bu endotermik pik, buz kristallerinin füzyonunun başladığını göstermektedir. DTA ve Z eğrileri birlikte değerlendirildiğinde DTA'nın ekzotermik piki ile impedansın artmaya başladığı nokta arasındaki ilişki donmuş yapının yeniden düzenlenmesini ifade etmektedir. İmpedans eğrisinin ekzotermik bir pikin ardından aşağı doğru hızla artarak düşüşü ile DTA'daki endotermik pikin başlangıcı donmuş maddenin yumuşadığını maddenin erimeye başlayarak faz değiştirdiğini göstermektedir. Eğriler üzerinde belirli kritik noktalar işaretlenerek Tablo 1 de gösterilmiştir.

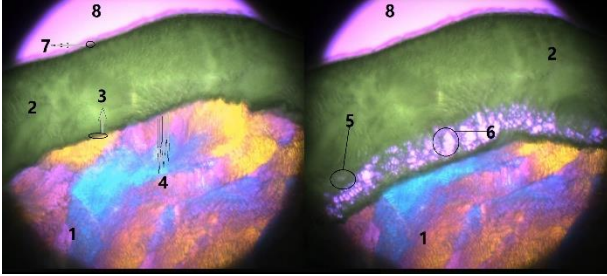


Şekil 1. Diferansiyel Termal Analiz Cihazında Elde Edilen DTA ve İmpedans Isınma Eğrileri

Tablo 1. Farklı Mineral Tuzlarını İçeren Mannitol Çözeltilerinin DTA (D) ve İmpedans (Z) Eğrilerinde İşaretlenen Kritik Noktalar

	Z1	Z2	Z3	Z4	D1	D2	D3	D4
NaCl+ Mannitol	-87,53	-47	-42,28	-23,42	-31,4	-27	-9,48	-1,06
KCl+ Mannitol	-86,56	-33,25	-24,38	-13,56	-33,57	-29,16	-8,54	-0,85
MgCl ₂ + Mannitol	-117,91	-91,43	-79,74	-26,51	-39,99	-24,95	-9,99	-1,02
FeCl ₃ + Mannitol	-99,15	-58,32	-46,98	-24,28	-34,83	-26,94	-9,98	-1
Mannitol	-40,76	-6,71	-3,88	-0,52	-28,11	-24,41	-5,13	-0,08

Dondurulmuş üründeki sıcaklığın artırılması ile FDM de elde edilen görüntü Şekil 2’de verilmiştir. Şekil üzerindeki 8 numaralı alan mikroskop lamını, 1 numaralı alan materyalin donduğu alanı, 2 numaralı alan ise donmanın ardından kurumanın başladığı alanı göstermektedir. 7 numaralı numune hattından başlayan süblimizasyon oranı 4 numara ile gösterilen süblimizasyon hareket yönünde devam etmektedir. 3 numaralı süblimizasyon hattından 1 numaralı donmuş alana doğru süblimizasyon devam ederken çökmenin başladığı noktalar tespit edilmiştir. 5 numaralı bölgede başlayan çökmeler 6 numaralı bölgede tam çökmenin gözlemlenmesiyle daha net fark edilmektedir. Sıcaklık artırılırken gözlemlenen örnek kurutma şeklinin sol tarafında, tam çöküşün yaşandığı (Tc / Teu) sıcaklık değeri ise şeklinin sağ tarafında gösterilmektedir. Kristalizasyon (Tc), çökmenin olabileceği ötektik sıcaklık (Teu) ve erimenin olduğu (Te) sıcaklıkları çalışma sonunda Tablo 2’de verilmiştir.



Şekil 2. Freeze Dry Mikroskop Görüntüsü

Tablo 2. Farklı Mineral Tuzlarını İçeren Mannitol Çözeltilerinin DTA ve FDM ile Belirlenen Liyofilizasyon Prosesini Etkileyen Kritik Kontrol Noktaları

	Teu/Tc	Te	Tcry/Tg
NaCl	-40,46	-1,06	-42,28
KCl	-22,56	-0,85	-25,38
MgCl ₂	-77,92	-1,02	-79,74
FeCl ₃	-45,16	-1	-46,98
Mannitol	-2,01	-0,08	-3,88

Tartışma

Biyolojik maddelerin kurutulmasında koruyucu ajanların kullanılması önemli olmaktadır ve liyofilizasyon öncesi çözeltilerin termal analizleri yapılması gerekmektedir (Zhai ve ark., 2003; Baheti ve ark., 2010). Kurutulduğunda yeterince sağlam bir çatı oluşması açısından dondurarak kurutulacak çözeltinin katı içeriğinin belirli bir derişimde olması istenmektedir (Ito, 1971; Johnson ve ark., 2002). Tuzların liyofilize ürün satabilizörü olarak kullanılması ve konsantrasyon ayarlaması önem arz etmektedir. Tuzlar kristal yapıya sahip olduklarından yüksek konsantrasyonlarda kullanılması hücrenin canlılığını etkilemekte ve

liyofilizasyon sonrasında sağ kalım oranının düşürmektedir. Bu sebeple kullanılan tuzun yapısı ve konsantrasyonunun belirlenmesi gerekmektedir (Hawe ve Frieß, 2006). Kristal iskeletin arasından buharlaşma kolay olduğu için liyofilizasyon sonrası nem oranı düşük olması tuzların avantajı olarak görülmektedir. Diğer yandan amorf yapılar canlı hücreler için mükemmel bir matris oluştururken, su tutuşu yüksek olan bu yapılarda buharlaşma yavaş olmakta ve çoğu zaman bağlı su uzaklaştırılmamaktadır (Shah ve ark., 2006). Bu nedenle de farmakolojik ürünün neminin yüksek depolama süresinin ise kısa olması dezavantaj olarak görülmektedir (Jenning, 1999). Mannitol molekülü liyofilize edilecek numuneleri stabilize etmek yerine sağlam ve zarif kek yapıları sağlayan kristal yapı iskeletleri oluşturmaktadır. Dondurularak kurutma işlemi sırasında kısmi kristalleşme depolanma sırasında amorf fraksiyonun daha sonra kristalleşmesine neden olduğu için, kontrollü ve eksiksiz kristalleşmeler daha değerli olmaktadır. Kısmi kristalleşme, nihai ürünün yapısının bozulmasına ve dolayısıyla raf ömrünün azalmasına neden olduğu için istenmemektedir. Kristalleşme temel olarak, kurutma başlamadan önce ısı işlem sırasında meydana gelmektedir (Horn ve Friess, 2018). Mannitol kendi başına kristal ya da amorf gibi davranabilmektedir (Cavatur ve ark., 2002). Bu nedenle bu çalışma ile belirlenen farklı tuzları içeren mannitol solüsyonlarının liyofilizasyon prosesini etkileyen kritik sıcaklıkları önemli olmaktadır. Bu çalışmada mannitolün Teu ve Tc değerleri yüksek olduğu için (Tablo 2) bu değerler liyofilizasyonun kalitesi açısından başarılı bir sonucu ifade etmektedir (Rey, 1960). Tuzlu mannitol çözeltilerinde ise kritik sıcaklıklar daha düşük bulunmuştur. Özellikle Mg ve Fe tuzları çözeltinin Teu ve Tc değerlerini düşürerek primer kurutmanın daha düşük sıcaklıklarda bitirilmesini gerektirmektedir. Bu nedenle Magnezyum (Mg) ve Demir (Fe) tuzlarının liyofilizasyonda ekşiyan olarak kullanılması tavsiye edilmemektedir. Çünkü bu sonuç zor ve daha masraflı bir primer kurutma prosesini ifade etmektedir. Tüm bunlara rağmen tuzların daha stabil ve kaliteli kuruma sağladıkları ve mannitolün yapısını güçlendirdikleri bilinmektedir (Telang ve ark., 2003).

Çalışmada elde edilen verilere göre (Tablo 1) mannitol çözeltilerine eklenen Sodyum (Na) ve Potasyum (K) tuzları diğer tuzlara göre daha yüksek sıcaklıklarda kararsızlaştıkları için kryoprezervatif olarak tercih edilmelidir. Fakat belirlenen primer kurutma üst limitlerinin 1-3 °C altında primer kurutma bitmiş olması gerekmektedir (Adams ve ark., 2015). Ayrıca belirlenen Tc de maddenin kararlı kalması için sıcaklık-vakum dengesinin iyi

ayarlanması, Te de maddenin içerisinde bağlı su mümkün olduğunca uzaklaşmış olması gerekmektedir (Tablo 2). Tc değerlerinin, çoğu zaman karşılık gelen Tg 'değerlerinden daha yüksek (2-5°C) olduğu rapor edilmiştir (Meister ve ark., 2009).

Donma prosesi ile maddelerin yapısında oluşan buzun süblimasyonunu sağlamak için her solüsyonun kendi üçlü noktasının altındaki sıcaklık ve basınç koşullarında primer kurutması gerçekleştirilmelidir (Tablo 1). Primer kurutma sıcaklığının, kek yapısının kaybını önlemek için mümkün olduğu kadar yüksek, ancak kritik işlem sıcaklığının altında tutulması gerekmektedir (Pikal, 1990). NaCl liyofilizasyonda yaygın olarak kullanılan ekşiyan olduğu için mannitol ile etkileşimi daha çok araştırılmaktadır (Lu ve Pikal, 2004). Na, Mg, K ve Fe tuzlarının nem tutucu özelliğinin araştırıldığı çalışmalar bulunmaktadır (Van den Berg ve Rose, 1959, Thorat ve ark., 2017). Na, Mg, K ve Fe tuzlarını içeren mannitol çözeltileri için sunulan çalışma sonuçları dikkate alınarak primer kurutma prosesi düzenlenmesi tavsiye edilmektedir.

Kaynaklar

- Adams GDJ, Cook I, Ward KR (2015) The principles of freeze-drying. *Methods Mol Biol* 1257:121-143. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2193-5_4
- Andrade ÂL, Militani IA, de Almeida KJ, Belchior JC, dos Reis SC, Costa e Silva RMF, Domingues RZ (2018) Theoretical and experimental studies of the controlled release of tetracycline incorporated into bioactive glasses. *AAPS PharmSciTech* 19 (3), 1287-1296. <https://doi.org/10.1208/s12249-017-0931-x>
- Arshad MS, Smith G, Polygalov E, Ermolina I (2014) Through-vial impedance spectroscopy of critical events during the freezing stage of the lyophilization cycle: the example of the impact of sucrose on the crystallization of mannitol. *Eur. J Pharm Biopharm* 87, 598–605. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.05.005>
- Baheti A, Kumar L, Bansal AK (2010) Excipients used in lyophilization of small molecules. *J Excipients and Food Chem* 1, 41-54. <https://ojs.abo.fi/ojs/index.php/jefc/article/view/21>
- Cavatur RK, Vemuri NM, Pyne A, Chrzan Z, Toledo-Velasquez D, Suryanarayanan R (2002) Crystallization behavior of mannitol in frozen aqueous solutions. *Pharm Res*, 19 (6), 894–900. <https://doi.org/10.1023/a:1016177404647>
- Day JG, Stacey GN (2007) Cryopreservation and freeze-drying protocols. Human Press, New Jersey.
- Hawe A, Friess W (2006) Impact of freezing procedure and annealing on the physico-chemical properties and the formation of mannitol hydrate in mannitol-sucrose-NaCl formulations. *Eur J Pharm Biopharm* 64, 316–325. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.06.002>
- Horn J, Friess W (2018) Detection of collapse and crystallization of saccharide, protein, and mannitol formulations by optical fibers in lyophilization. *Frontiers in Chemistry* 6 (4) 1-9 <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00004>
- Ito K (1971) Freeze drying of pharmaceuticals. Eutectic temperature and collapse temperature of solute matrix upon freeze drying of three component systems. *Chem Pharm Bull* 19 (6), 1095–102. <https://doi.org/10.1248/cpb.19.1095>
- Izutsu K, Yoshioka S, Terao T (1994) Effect of mannitol crystallinity on the stabilization of enzymes during freeze-drying. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 42 (1), 5-8. <https://doi.org/10.1248/cpb.42.5>
- Jennings AT (1999) Lyophilization, introduction and basic principles. CRC Press, USA.
- Johnson RE, Kirchoff CF, Gaud HT (2002) Mannitol-sucrose mixtures-versatile formulations for protein lyophilization. *Journal Pharm Sci* 91 (4), 914-922. <https://doi.org/10.1002/jps.10094>
- Kasper JC, Friess W (2011) The freezing step in lyophilization: Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality at-tributes of biopharmaceuticals. *Eur J Pharm Biopharm* 78, 248-263. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.03.010>
- Lu X, Pikal MJ (2004) Freeze-Drying of mannitol-trehalose-sodium chloride-based formulations: the impact of annealing on dry layer resistance to mass transfer and cake structure. *Pharm Dev Technol*, 9 (1), 85-95. <https://doi.org/10.1081/PDT-120027421>
- Lueckel B, Bodmer D, Helk B, Leuenberger H (1998) Formulations of sugars with amino acids or mannitol – influence of concentration ratio on properties of the freeze-concentrate and the lyophilisate. *Pharm Dev Technol*, 3, 325–336. <https://doi.org/10.3109/10837459809009860>
- Martin C, Ross C, Peacock T, Ward K R (2007) Application of electrical impedance analysis for investigation of nutraceutical formulation stability in the frozen state. SET for Britain presented at the House of Commons, London,
- Meister E, Gieseler H (2009) Freeze-dry microscopy of protein/sugar mixtures: drying behavior, interpretation of collapse temperatures and a comparison to corresponding glass transition data. *J PharmSci*, 98(9), 3072-3087. <https://doi.org/10.1002/jps.21586>
- Meister E, Šaši S, Gieseler H (2009) Freeze-dry microscopy: impact of nucleation temperature and excipient concentration on collapse temperature data. *AAPS Pharm Sci Tech* 10 (2), 582-588. <https://doi.org/10.1208/s12249-009-9245-y>
- Patel RM, Hurwitz A (1972) Eutectic temperature determination of preformulation systems and evaluation by controlled freeze drying. *J Pharm Sci* 61 (11), 1806-1810. <https://doi.org/10.1002/jps.2600611125>

- Pikal MJ** (1990) The collapse temperature in freeze drying: Dependence on measurement methodology and rate of water removal from the glassy phase. *Inter J Pharm*, 62, 165-186. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(90\)90231-R](https://doi.org/10.1016/0378-5173(90)90231-R)
- Pikal MJ** (2001) Lyophilization. In *encyclopedia of pharmaceutical technology*; Swarbrick, J, Boylan, J.C., Eds.; Marcel Dekker, New York, USA.
- Rey L** (1960) Thermal analysis of eutectics in freezing solutions. *Ann NY Acad Sci* 85(2), 510-34. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1960.tb49979.x>
- Shah B, Kakumanu VK, Bansal AK** (2006) Analytical techniques for quantification of amorphous/crystalline phases in pharmaceutical solids. *J Pharm Sci* 95, 1641-1665. <https://doi.org/10.1002/jps.20644>
- Shalaev EY, Franks F** (1996) Crystalline and amorphous phases in the ternary system water-sucrose-sodium chloride. *J Phys Chem*, 100, 1144-1152. <https://doi.org/10.1021/jp951052r>
- Telang C, Yu L, Suryanarayanan R** (2003) Effective inhibition of mannitol crystallization in frozen solutions by sodium chloride. *Pharm Res* 20 (4), 660-667. <https://doi.org/10.1023/a:1023263203188>
- Thorat AA, Forny L, Meunier V, Taylor LS, Mauer LJ** (2017) Effects of chloride and sulfate salts on the inhibition or promotion of sucrose crystallization in initially amorphous sucrose-salt blends *J Agric Food Chem* 65, (51), 11259-11272. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04746>
- Van den Berg L, Rose D** (1959) Effect of freezing on the pH and composition of sodium and potassium phosphate solutions: the reciprocal system $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4\text{-H}_2\text{O}$. *Arch Biochem Biophys*, 81 (2), 319-29. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90209-7](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90209-7)
- Yu L, Milton N, Groleau E, Mishra D, Vansickle R** (1999) Existence of a mannitol hydrate during freeze-drying and practical implications. *J Pharm Sci* 88, 196-198. <https://doi.org/10.1021/js980323h>
- Zhai S, Taylor R, Sanches R, Slater NKH** (2003) Measurement of lyophilisation primary drying rates by freeze drying microscopy. *Chem Eng Sci* 58 (11), 2313-2323. [https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(03\)00090-3](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(03)00090-3)andr