پایدار سازی فرآورده‌های لیپوزومی لیوفیلیزه

دکتر فریده محمودزاده، فارغ‌التحصیل دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر فرزاد اسدی، دانشجوی دوره دکترای گروه بیوشیمی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر محمود دوستی، استاد گروه بیوشیمی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

Stabilization of Liophilized Liposomal Products

Abstract

Liposomes as a drug carrier have numerous dominancy. Liophilization is the most propr form of these products for long-term maintenanace, but this procedure is affected by unstabilizing agent that results in destruction of membrane, release of content and change in size and microbial contamination; hence for prevention of the adverse effects, the protective role of sugars such as: Maltose, Fructose, Glucose, Galactose, Saccharose and Lactose were studied.

For this purpose, after preparation of liposomal suspention, categorized in four duplicate groups and concentrations of 25, 50, 100 percent of these sugars were added to those. On the basis of color and consistency of products, the best method of freezing is as application of absolute alcohol and then chilling in -7o oc for 16 h. In survey of protective substances concentrations 0.7, 1.4, 2.8, and 5.6 percent of the mentioned sugars were used for calculating of leakage percent (Upon on the ratio of optical density of treated samples to untreated).

In this study, released maltose had highest effect. Level of fusion and aggregation had any significant difference between pre and post liophilized samples in centrifugation with 10000 rpm. Microbial state of recent samples were studied by culturing in SCD and SCDA media that indicated microbial growth in both samples.

Key Words: Stabilization, Liophilization, Liposome

چکیده

لیپوزوم ها بعنوان یک حامل دارویی از مزایای متعددی برخوردارند. لیوفیلیزاسیون مناسب ترین شکل نگهداری طولانی مدت این فراورده‌هاست؛ ولی این فرایند نیز تحت تاثیر عوامل ناپایدارکننده‌ای قرار می‌گیرد که موجب تخریب، آزاد سازی ماده محصور، تغییر اندازه و آلودگی میکروبی فرآورده‌های لیپوزومی می شود.

در این مطالعه نقش حفاظتی قندهای مالتوز، فروکتوز، گلوکز، گالاکتوز، سوکروز و لاکتوز در جلوگیری از این پدیده مورد بررسی قرار گرفت، بطوریکه پس از تهیه سوسپانسیون لیپوزومی، آنها را به ۴ گروه دوتایی تقسیم نموده و غلظت های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-05]

درصد از این قندها به سوسپانسیون اضافه گردید. بر مبنای رنگ و قوام محصول حاصله، بهترین روش فریز، استفاده از الکل مطلق و متعاقباً بکارگیری درجه حرارت ۷۰- درجه سانتیگراد بمدت ۱۶ ساعت بدست آمد. در بررسی ماده محافظ غلظت های ۰/۷، ۱/۴، ۲/۸ و ۵/۶ درصد قندهای ذکر شده را استفاده کرده و درصد تراوایی (با استفاده از نسبت جذب نوری نمونه لیوفیلیزه به لیوفیلزه نشده) محاسبه گردید.

در این مطالعه، قند مالتوز از بیشترین تاثیر برخوردار بود. میزان هم جوشی و تجمع در نمونه های قبل و بعد از لیوفیلیزاسیون در سانتریفوژ با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه اختلافی با هم نداشتند؛ همچنین وضعیت میکروبی نمونه های قبل و بعد از لیوفیلیزاسیون با کشت آنها در دو محیط SCD و SCDA مورد مطالعه قرار گرفت که در هر دو محیط با رشد میکروب توأم بود.

مقدمه

لیپوزومها یا وزیکولهای لیپیدی ساختمان کروی شکل بسته‌ای هستند که در آن لیپید ها بصورت ساختمان دو لایه ای قرار گرفته اند و در بخش مرکزی خود یک قسمت مائی را محصور نموده‌اند. لیپوزومها از یک یا چند غشاء دو لایه تشکیل یافته‌اند؛ اندازه آنها ۲۰ نانومتر تا چند میکرومتر و ضخامت غشاء آنها تقریباً ۴ نانومتر است. لیپوزومها مواد و داروهای محلول در آب را در بخش مائی خود و مواد و داروهای محلول در چربی را در بین غشاءهای دولایه فسفو لیپیدی خود محصور می نمایند.

لیپوزومها بعنوان یک حامل دارویی بدلیل برخورداری از مزایای متعددی از قبیل کنترل سرعت آزاد سازی، هدفگیری دارو، حفظ دارو در مقابل عوامل موجود در گردش خون ، رساندن دارو به داخل سلول هدف و ...، روز به روز بیشتر مورد توجه قرار می گیرند؛ ولی مشکل اصلی بر سر راه ورود لیپوزومها به بازار دارویی ناپایداری آنها خصوصاً در مورد داروهای محلول در آب در طول زمان قبل از مصرف می باشد(۱). این ناپایداری شامل انواع فیزیکی (تراوایی، تجمع و هم جوشی) ، شیمیایی (اکسیداسیون و هیدرولیز) و بیولوژیک (آلودگیهای میکروبی) است(۲). بنابراین سوسپانسیون های لیپوزومی دارای استانداردهای لازم برای پایداری طولانی مدت نیستند. برای بهبود نیمه عمر لیپوزومها، روشهای مختلفی از قبیل : تهیه لیپوزومها هنگام مصرف ، تولید پرولیپوزوم ، ذخیره سوسپانسیون‌های غلیظ، خشک کردن به روش اسپری و لیوفیلیزاسیون و منجمد کردن مورد بررسی قرارگرفته اند. در این بین روشهای لیوفیلیزاسیون و پرولیپوزوم برای داروهای محلول در چربی و لیوفیلیزاسیون برای داروهای محلول در آب مناسب‌ترین هستند. لیوفیلیزاسیون مناسبترین روش پایداری طولانی مدت فرآورده‌های لیپوزومی می باشد و قادر است که حداکثر پایداری را فراهم آورد؛ زیرا تمام واکنش های فیزیکی و شیمیایی در حالت خشک به حداقل می رسند و امکان نگهداری آنها در حرارت اتاق زیاد می شود. در این روش ابتدا دارو را در حلال (ترجیحاً آب) بصورت سوسپانسیون درمی‌آورند و سپس محلول را در زیر نقطه اوتکتیک(Eutectic point) [۱۱] منجمد می‌کنند (۳) و متعاقب آن طی گرم کردن در شرایط خلاء، کریستال های آب آن از دست می‌رود و طی دو مرحله خشک کردن، رطوبت آن به کمتر از ۱/۳ درصد می رسد(۴).

لیوفیلیزاسیون فرآورده‌های لیپوزومی با مشکلات متعددی از قبیل : آزاد شدن تقریباً کامل ماده محصور شده ، افزایش اندازه لیپوزومها دراثر پدیده‌های تجمع و هم جوشی، افزایش تشکیل کریستال یخ در داخل و

---

۱ – به فشار دمایی اطلاق می شود که در آن نقطه ماده جامد یخ زده (حاوی آب و ماده دارویی) می تواند بدون تبدیل شدن به مایع بخار شود.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-05]

خارج لیپوزوم و همچنین عبور از دمای تغییر فاز همراه است(۵). با مطالعه در طبیعت ملاحظه می گردد که بسیاری از ارگانیسم ها مانند اسپور قارچها ، مخمرها، نماتودهای بالغ و نیز لارو آنها و ... قادرند شرایط انجماد و خشک را تحمل کنند بنابراین می توان به این موضوع رسید که در ساختمان آنها مقادیر زیادی قند وجود دارد که باعث جلوگیری از مرگ سلول در مواجهه با این شرایط می شود(۶)؛ از اینرو بنظر می رسد استفاده از مواد محافظ و اتخاذ شرایط مناسب می تواند از آسیب های وارده در طی لیوفیلیزاسیون جلوگیری نماید. تحقیقات و مطالعات زیادی بر روی استفاده از قندها بعنوان مواد محافظ صورت گرفته و درآزمایشات مختلف از غلظت های مختلف انواع قندها استفاده شده که با نتایج متفاوت وگاهی متناقض از تأثیر مواد محافظ در جلوگیری از تخریب، آزاد سازی ماده محصور شده، تغییر اندازه لیپوزومها و آلودگیهای میکروبی در طی مراحل فریز و خشک کردن همراه بوده است(۸و۷). در این مطالعه برخی از قندها بعنوان مواد محافظ مورد استفاده قرارگرفتند و تأثیر آنها روی موارد اخیر مورد بررسی واقع شد.

روش و مواد

لسیتین تخم مرغ با درجه خلوص ۹۹/۵ درصد با ۰/۵ درصد ناخالصی بصورت اسفنگومیلین، D-(-)فروکتوز، D-(+)گلوکز هیدرات و D-(+) گالاکتوز از شرکت Merk، مالتوز از شرکت Sigma، سوکروز و لاکتوز از شرکت Fluka ،الکل اتانول ۹۸ درجه، کرومات پتاسیم ،تریتون X-۱۰۰ و دستگاه اسپکترومتر Lkb-novaspec از شرکت Pharmacia، دستگاه اولتراسانتریفوژ Optima t1از شرکت Beckman، دستگاه تبخیر حلال New Rotatory Evaporator Ne-1 و دستگاه Freeze dryer از شرکت Tokyo Rikakika و دستگاه Shaker GFL Gf از شرکت LKB مورد استفاده قرار گرفت.

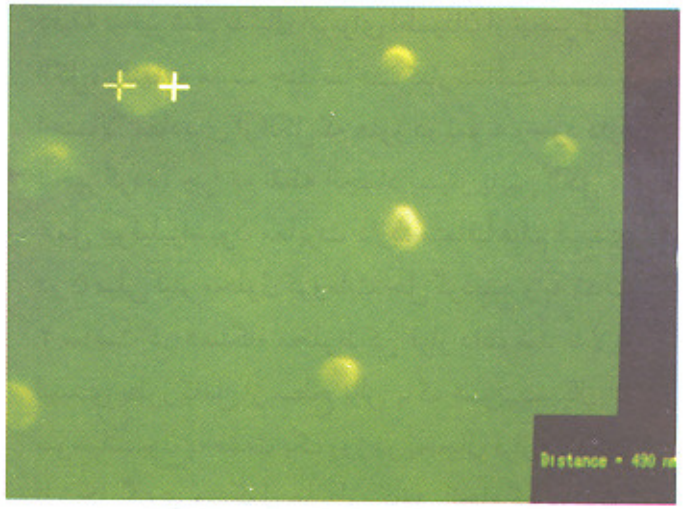
تهیه سوسپانسیون لیپوزومی:

برای تهیه لیپوزومهای چند لایه با روش تک فازی، در یک بالن ته گرد به حجم ۱۰۰ میلی لیتر، مقدار ۲۰ میلی گرم لسیتین تخم مرغ را در ۱۰ میلی لیتراتانول ۹۶ درجه حل نموده و آنگاه ۰/۵ میلی لیتر از محلول کرومات با غلظت ۳-۱۰×۴ مولار از قند با غلظت w/v ۲/۵٪ به ان اضافه گردید تا یک محلول تک فازی از لیپید، اتانول و فاز مائی تشکیل شود.الکل نمونه در دستگاه تبخیر دوار در دمای ۳۰ درجه با ۱۰۰ دور در دقیقه طی ۲۰ دقیقه تبخیر شد. بدنبال آن برای اطمینان از تبخیر کامل الکل، بالنها به مدت چند ساعت کنارگذاشته شدند تا احتمالا" مقادیری از الکل که هنوز در نمونه وجود دارد تبخیر گردد، چرا که نقطه انجماد بسیار پایین الکل با عمل لیوفیلیزاسیون مغایرت دارد. متعاقباً فیلم لیپیدی در ۵ میلی لیتر محلول کرومات حل گردیده و به مدت ۲ ساعت در دستگاه مخلوط کن قرار داده شد تا لایه لیپیدی بطور کامل از سطح بالن پاک شود.بدنبال آن سوسپانسیون به مدت یک روز در یخچال قرار داده شد تا شکل گیری وزیکول ها بطور کامل انجام گیرد(شکل ۱). پس از آن برای جداسازی داروی محصور نشده از اولتراسانتریفوژ ۳۰۰۰۰ دور در دقیقه طی ۳۵ دقیقه برای جداسازی مایع روئی و ۲۰۰۰۰ دور در دقیقه طی ۱۵ دقیقه برای جداسازی باقیمانده کرومات از رسوب استفاده گردید. کرومات پتاسیم بعلت حلالیت بالای خود در آب، همانند داروهای محلول در آب عمل می نماید؛ ضمن اینکه در طول موج ۳۸۰ نانومتر (ماوراء بنفش) دارای حداکثر جذب نوری می باشد. در نهایت برای محاسبه کرومات پتاسیم محصور شده از جذب نوری آن در طول موج ۳۸۰ nm بر روی منحنی استاندارد استفاده شده است . برای رسم منحنی استاندارد رقت های ۰/۰۰۰۵ ، ۰/۰۰۰۲ ، ۰/۰۰۰۳ و ۰/۰۰۰۴ مولار از کرومات پتاسیم تهیه گردید و میزان جذب نوری هرکدام در طول موج ۳۸۰ نانومتر اندازه

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-05]

گیری شد و منحنی استاندارد رسم گردید.

در ادامه جهت محاسبه کارایی محصور سازی به رسوب حاصل از سانتریفوژ ۱ میلی‌لیتر تریتون X-۱۰۰ ده درصد حجمی و۲ میلی لیتر آب مقطر اضافه و در بن‌ماری ۴۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد، بدین ترتیب کرومات محصور شده آزاد می‌گردد. جذب نوری محلول حاصله در مقابل شاهد قرائت گردید. در ضمن باید توجه داشت که تریتون ۱۰۰- X و لسیتین در ۳۸۰ نانومتر جذب قابل توجهی ندارند.



شکل ۱ ـ تصویر میکروسکوپ الکترونی وزیکول ها ـ بزرگنمایی ۱۵۷۰۰

الف) فریزکردن نمونه ها:

در ۸لوله سانتریفوژ هر یک ۳ میلی لیتر از سوسپانسیون لیپوزومی ریخته و پس از دو مرحله سانتریفوژ ماده محصور نشده جدا گردید و لیپوزوم ها به صورت رسوب در ته لوله ها باقی ماندند، سپس لوله ها را به ۴ گروه دوتایی تقسیم کرده و به ترتیب ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌لیتر از سوکروز ۱۰ درصد به آنها اضافه شد و با آب مقطر به حجم ۳/۵ رسید. یک سری از لوله ها در فریزر ۶۰- درجه سانتیگراد و سری دوم در قسمت فریزر دستگاه FREEZE DRYER قرار داده شد (دراین دستگاه با گذشت یک ساعت دما به ۵۰ - درجه سانتیگراد خواهد رسید) و پس از گذشت ۳۰ دقیقه نمونه ها به مدت یک روز در فریزر ۶۰- درجه سانتیگراد قرار داده شدند، سپس به مدت ۸ ساعت عمل خشک کردن صورت گرفت. نمونه های سری اول ظاهری زرد رنگ و نامناسب داشتند و تقریباً تمام ماده محصور در آنها آزاد شده بود ولی سری دوم بصورت پودر سفید رنگی درآمده بودند که بخوبی در آب حل می‌شدند و ظاهر بیرنگی پیدا می‌کردند که حاکی از عدم تراوایی کرومات از لیپوزوم‌ها بود.اگر نمونه های سری دوم پس از ۳۰ دقیقه فریز در دستگاه FREEZE DRYER خشک گردند، حالت خمیری شکلی بخود خواهند گرفت. این آزمایش با قند مالتوز نیز تکرار گردید و همین مشاهدات حاصل شد. از اینرو در ادامه مطالعه ابتدا نمونه ها بمدت ۴۵ دقیقه در الکل مطلق و بعد از آن حدود ۱۶ ساعت در دمای ۷۰ - درجه سانتیگراد قرارگرفتند تا عمل فریزکردن صورت گیرد.

ب) انتخاب ماده محافظ :

غلظت های ۰/۷ ، ۱/۴ ، ۲/۸ و ۵/۶ درصد از قندهای لاکتوز، مالتوز، فروکتوز، گلوکز و گالاکتوز تهیه شده و با روش ذکر شده لیوفیلیزه گردیدند. برای ارزیابی نوع و تأثیر غلظت هریک از این قندها، درصد تراوش (برمبنای نسبت جذب نوری نمونه لیوفیلیزه به لیوفیلیزه نشده) محاسبه گردید (نمودارهای ۵ - ۱).

ج) وقوع همجوشی و تجمع :

بدلیل عدم امکان استفاده از میکروسکوپ الکترونی از سرعت رسوب گذاری برای تعیین این عامل استفاده گردید. برای این منظور بعد از جداسازی ماده محصور نشده از رسوب لیپوزوم‌ها، رسوب اخیر را در آب مقطر حل نموده و قبل و بعد از لیوفیلیزاسیون چهار بار و هر بار بمدت ۳ دقیقه با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ نموده و در پایان هر مرحله وزن رسوب حاصله مورد اندازه‌گیری قرارگرفت. برای این منظور وزن تام لوله و رسوب از وزن لوله خالی کسر گردید.

د) کنترل میکروبی نمونه :

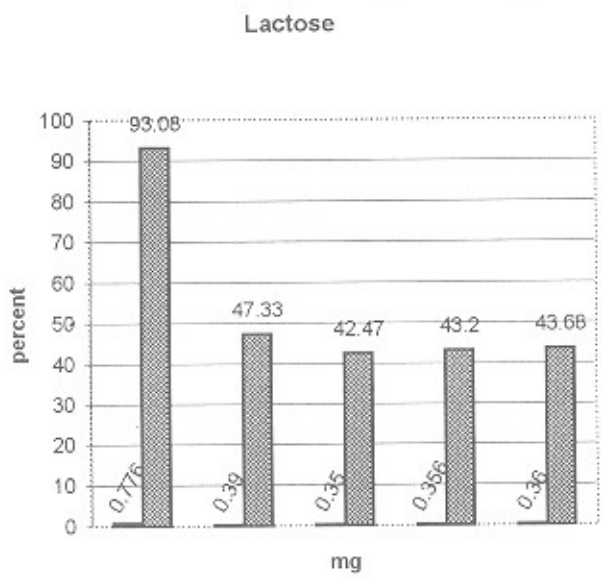
برای ارزیابی وضعیت میکروبی نمونه لیوفیلیزه

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-05]

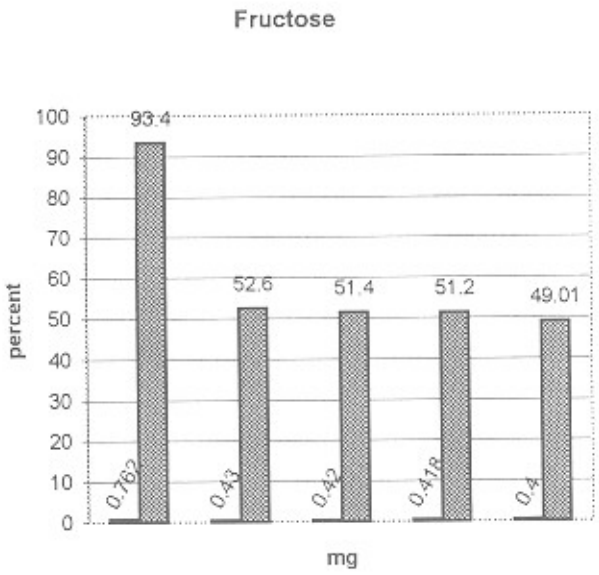
آزمایش زیر طراحی شد:
در ۶ لوله آزمایش بترتیب در دوتای اول ۲ میلی لیتر نمونه لیپوزومی ، دوتای دوم ۲ میلی لیتر نمونه لیپوزومی همراه با ۱ میلی لیترگالاکتوز ۱۰ ٪ و دوتای سوم ۲ میلی لیتر نمونه لیپوزومی و ۲ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد. تمامی لوله ها تحت عمل لیوفیلیزاسیون قرارگرفتند. در مقابل در دو لوله آزمایش دیگر ۲ میلی لیتر نمونه لیپوزومی ریخته ولی لیوفیلیزه نشدند. محتوای هریک از لوله ها در دو محیط Soya Bean Casein Digest (SCD)و جامد Soya Bean Casein Digest Agar (SCDA)کشت داده شدند. دو محیط کشت نیز بعنوان شاهد نگهداری گردیدند.

نتایج

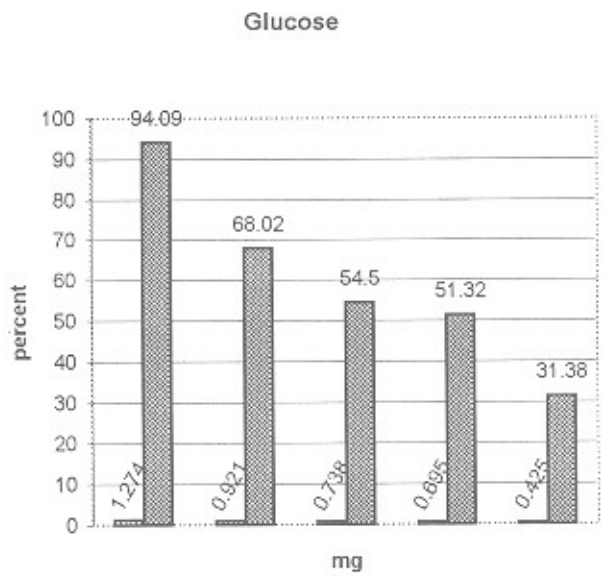
اثر حفاظتی قندهای لاکتوز، فروکتوز، گلوکز، مالتوز و گالاکتوز در جلوگیری از تراوائی لیپوزوم ها مورد سنجش قرارگرفت که در نمودارهای ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ آمده‌است. مقایسه تاثیر حفاظتی قندهای فوق در غلظت های مختلف در قسمت بحث و نتیجه گیری به تفضیل مورد بررسی قرار می گیرد.



نمودار ۱- اثر غلظت های مختلف لاکتوز در جلوگیری از تراوائی لیپوزوم ها



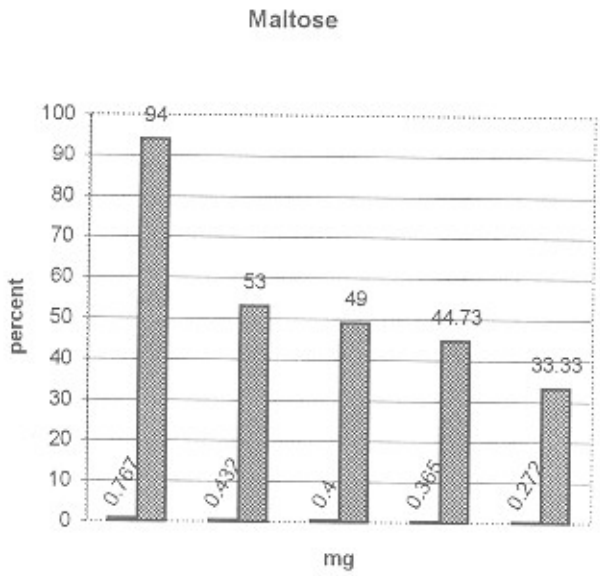
نمودار ۲- اثر غلظت های مختلف فروکتوز در جلوگیری از تراوائی لیپوزوم ها



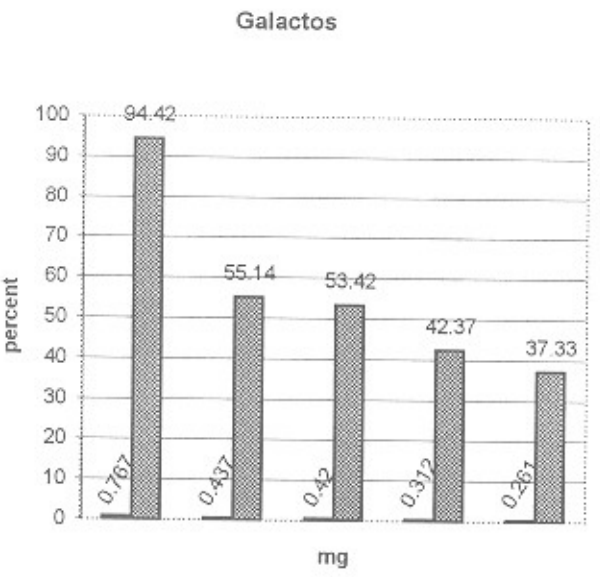
نمودار ۳ - اثر غلظت های مختلف گلوکز در جلوگیری از تراوائی لیپوزوم ها

در بررسی وقوع همجوشی و تجمع ، وزن نمونه های قبل (۲/۰۹۷ ، ۲/۱۱۰ ، ۲/۱۱۵ و ۲/۱۲۷) و بعد از لیوفیلیزاسیون (۲/۱۰۰ ، ۲/۱۱۳ ، ۲/۱۱۱ و ۲/۱۲۸)برحسب میلی گرم اختلاف قابل توجهی را نشان نمی دهند.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-05]



نمودار ۴- اثر غلظت های مختلف مالتوز در جلوگیری از تراوائی لیپوزوم‌ها



نمودار ۵- اثر غلظت های مختلف گالاکتوزدر جلوگیری از تراوائی لیپوزوم‌ها

در آزمایش کنترل میکروبی بجز دو پلیت شاهد در تمامی لوله ها رشد میکروبی دیده شد، بطوریکه تعداد کلونی ها در پلیت های محتوی نمونه لیوفیلیزه بیشتر از بقیه بود.

بحث

با توجه به نتایج حاصله می توان ابراز داشت که اتانول مطلق سرعت انجماد مناسبی را برای رسیدن به زیر نقطه اوتکتیک فراهم می سازد؛ بطوریکه بر خلاف نظر برخی از محققین که دماهای بالاتر از ۲۰- درجه سانتیگراد را در پایداری لیپوزوم ها مؤثر می دانند، در این مطالعه تقلیل دما به زیر نقطه اوتکتیک یک عامل بحرانی محسوب گردیده که موجب پایداری فرآورده های لیپوزومی در زیر این دما می شود(۱۰). در این مطالعه مشخص گردید که اثر حفاظتی لاکتوز در جلوگیری از پدیده تراوائی ارتباط چندانی با غلظت ندارد. همچنین نقش فروکتوز در جلوگیری از پدیده تراوائی فاقد ارتباط خطی با غلظت است، حال آنکه گلوکز در غلظت های بالا(۵/۶ ٪) و مالتوز وگالاکتوز در غلظت های مختلف (۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱) از نقش حفاظتی خوبی برخوردارند ولی در یک غلظت مشخص از دو قند، مالتوز از کارائی حفاظتی بیشتری نسبت به گالاکتوز برخوردار است. همچنین غلظت های بالاتر این قند (۰/۵ و ۱) از تأثیر حفاظتی بیشتری برخوردارند. علت این اختلافات می‌تواند ناشی از متفاوت بودن نوع لیپید، نوع و اندازه لیپوزوم‌ها و شرایط لیوفیلیزاسیون باشد که روی واکنش سر قطبی مولکول قند و تشکیل پیوند هیدروژنی با قسمت قطبی فسفولیپید های غشائی و پروتئین ها و در نهایت جایگزینی ملکول قند بجای آب اثر داشته باشد. در ضمن ریشه این اختلاف را می توان به تفاوت در افزایش ویسکوزیته، تشکیل ماتریکس شیشه‌ای یا جلوگیری از افزایش دمای تغییر فاز دراثر خشک شدن نسبت داد. این عمل باعث تغییر خواص فیزیکی اجزاء غشاء های خشک می شود، بطوریکه در هنگام آبگیری مجدد قندها، موجب تثبیت غشاءهای بیولوژیکی می گردد که با عمل لیوفیلیزاسیون خشک گردیده‌اند. این اثر قندها در غلظت های بیولوژیک مشاهده نمی‌شود. همچنین در این مطالعه تغییر معنی داری در کاهش پدیده همجوشی و تجمع ملاحظه نگردید که با تحقیقات قبلی اختلاف قابل توجهی را نشان

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-05]

می دهد(۱۰). از آنجائیکه غلظت مورد نیاز برخی از قندها جهت جلوگیری از همجوشی لیپوزوم های لیوفیلیزه خیلی کمتر از میزان مورد نیاز جهت مهار نشت می باشد، مهار همجوشی جهت حفظ لیپوزوم های خشک شده کافی نیست، ولی از آنجائیکه در این مطالعه نتیجه متناقضی حاصل شده می توان آنرا به شرایط فریز در این آزمایش نسبت داد. در نهایت با توجه به این که عمل لیوفیلیزاسیون در شرایط آسپتیک صورت نگرفت رشد میکروبی نمونه های لیوفیلیزه را می توان به این موضوع نسبت داد و از سوی دیگر از آنجائیکه رشد میکروبی در این نمونه ها از نمونه های لیوفیلیزه نشده و همچنین نمونه های بدون ماده محافظ بیشتر بود، می توان تصور کرد که شرایط ویژه اتخاذ شده باعث حفظ میکروبها شده است؛ از اینرو امکان استریل سازی لیپوزوم ها بوسیله حرارت مورد بررسی قرار گرفته و شرایط ویژه‌ای برای تحقق آن عنوان شده است(۱۱).

در هر حال نتایج بدست آمده نشان میدهد که می توان با انتخاب روش مناسب و شرایط مطلوب به بالای پایدارسازی دست یافت. ضمناً بهره‌گیری از چنین روشهای پایدارسازی فرم لیپوزومی برای داروهای مختلف میسر است. با توجه به اهمیت لیپوزوم ها و کاربرد متعدد آنها بعنوان سیستم های حامل دارو ضرورت انجام چنین مطالعاتی مشخص می گردد.

قدردانی و تشکر:
بدینوسیله از زحمات پرسنل محترم آزمایشگاههای گروههای بیوشیمی پزشکی و فیزیولوژی پزشکی تشکر و سپاسگزاری بعمل می آید.

منابع

1- Cho - y Ko - TS, Cha - SH, Da - DE. Properties of acetylcholin esterase reconstituted in liposomes of a different charge. Neurochem Res 1995 Jun;20(6):681-87.

2- Gruner SM, Lenk RP, Janoff AS, Ostrom J, Multilayered lipid vesicles: Comparison of physical characteristics of multilamellar vesicles. Biochemistry 1985;29:2833-42.

3- Ozer - y, Talsma H, Crommelin DJA, Hincal AA. Influence of freezing and freeze - drying on the stability of liposomes dispersed in aqueous media. Acta pharm Technol 1988:129-39.

4- Crow LM, Crow - JH, Rudoiph - A, Womersley S, Appel LP. Preservation of freeze-dried liposomes by trehalose. Arch Biochem Biophys 1985;242(1):240-47.

5- Hayashi H, Kono K, Takagishi T. Temperature - controlled release property of phospholipid vesicles bearing a thermo - sensitive polymer. Biochim-Biophys-Acta 1996 Apr;3:1280(1):127 - 34.

6- Martin - A. Physical Pharmacy. Philadelphia 1993:513-15.

7- mercadal - M, Domingo - JC, Bermudez - M, Mora - M, De - Madariga MA,N. Palmitoyl phosphatidyl ethanolamine stabilizes liposomes in the presence of lipidic composition and system characterization. Biochim-Biophys- Acta 1995 May;4:1235(2):281-8.

8- Gruner SM, Lenk RP, Janoff AS, Ostrom J, Multilayered lipid vesicles: Comparison of physical characteristics of multilamellar vesicles. Biochemistry 1985;29:2833-42.

9- Fransen GJ, Salemink PJM, Crommlia DJA, Critical parameter in freezing of liposomes. Int J Pharm 1986;33:27-35.

10- Talsma H, Ozer Y. Study of the stability of water - soluble drug containing liposomal dispersion after removing excess water by means of vaccum drying. Acta Phar Teech 1998; 34(1):225-28.

11- Tanaka K, Takeda T, Fuju K (Miyajimak). Water mediated interaction between phospholipid and saccharide in aqueous and frozen state. Chem Pharm Bull 1991;39(8):1917-21.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-05]