92農科-1.1.2-糧-Z4(1)(17 .P)

行政院農業發展委員會專題研究計畫
期末成果報告

【Chitosan-Liposome 包覆癌症藥物(Cantharidine)之研究】

計畫編號：92 農科-1.1.2 -糧-Z4(1)

執行期限：92 年 1 月 1 日至 92 年 12 月 31 日

計劃主持人：劉得任

計畫參與人員：劉得任

執行機構及單位名稱：臺北醫學大學生物醫學材料所

中文摘要

微脂粒穩定性的研究在其應用發展上佔有舉足輕重的影響，因此本研究利用低分子量水溶性幾丁聚醣來修飾微脂粒表面，觀測幾丁聚醣對微脂粒物理穩定性的影響，同時也一並探討包覆抗癌藥物斑蝥素，幾丁聚醣對微脂粒包覆斑蝥素的滲漏情形。

本實驗是以擠壓法(extrusion)製備微脂粒，並在製備完成的微脂粒溶液中嵌入幾丁聚醣-脂質。實驗結果顯示，嵌入幾丁聚醣-脂質於微脂粒溶液中，會使微脂粒的界面電位下降，並且對微脂粒的初始粒徑會有增大的現象。此外，嵌入幾丁聚醣-脂質會使微脂粒懸浮液濁度上升。另外，當幾丁聚醣的添加量大於1wt % 時，在25℃儲存溫度下，會加速微脂粒粒徑變大，造成所謂融合(fusion)的現象。至於脂質脂雙層分子間的影響，由DSC實驗中發現添加幾丁聚醣並不會影響微脂粒之相轉移溫度。關於斑蝥素滲漏實驗，無論是在25℃及4℃下，傳統型與表面修飾型(添加1wt% 幾丁聚醣)微脂粒的粒徑與滲漏速率，都無明顯差別。另外，在37℃下剪應力流場(300sec^{-1} 、800 sec^{-1})環境下，無論是在粒徑及滲漏速率的比較，實驗結果顯示傳統型與表面修飾型微脂粒都是無明顯之差異；不過，就不同剪應力流場對傳統型與表面修飾型微脂粒的影響，兩者(傳統型與表面修飾型微脂粒)皆顯示出在高剪切率(800 sec^{-1})的滲漏速率會高於低剪切率(300 sec^{-1})。

Abstract

Physical stability of liposomes plays the critical roles in various stages of the applications and development of liposomes. In this study, we applied low molecular weight chitosan to modify the liposomes surface, and investigated the physical stability of liposomes, Moreover, we encapsulated cantharidin to study the effects of

chitosan which cause drug leakage.

In this study, the liposomes were prepared by the extrusion method. Chitosan was added to liposome dispersion to obtain the mixtures of various compositions. We showed that chitosan decreased zeta potential, and increased the size of liposomes. Whereas, the addition of 1wt% chitosan had increased the size of liposome at 25℃, i.e. the behavior of fusion. Also, chitosan would increase the turbidity. Further, the DSC (differential scanning calorimeter) revealed that the addition of chitosan caused no difference in the intravesicle interaction.

To understand the behavior of cantharidin release, the conventional liposomes and modifier liposomes, revealed that there were no significant difference in size and the rate of drug release at 25℃ and 4℃. Shear forces (shear rate in 300sec^{-1} 、800 sec^{-1}) studies of the conventional liposomes and modifier liposomes showed that there were no significant difference in sizes and the rate of drug release at 37℃. Furthermore, both the conventional liposomes and modifier liposomes showed the rate of drug release was higher at shear rate in 800 sec^{-1} than shear rate in 300 sec^{-1}.

一計劃簡介

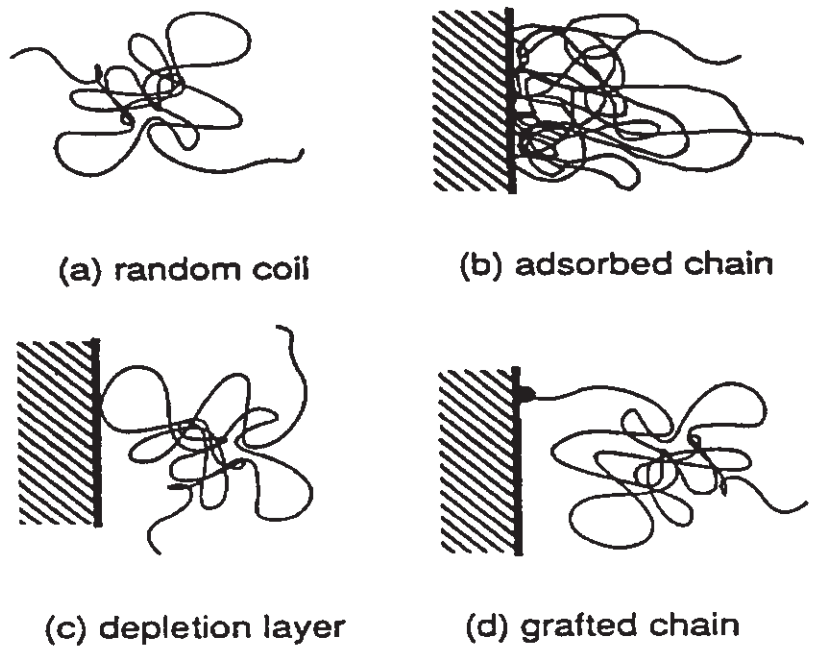
微脂粒是在 1965 年由英國科學家 Bangham 所發現，當磷脂質薄膜處於水相環境系統中，會形成許多類似洋蔥多層結構(multilamellar structure)的中空球體[1]，此即為微脂粒。由於微脂粒的結構組成類似生物膜(biomembrane)，因此，在早期，微脂粒間接提供了科學家用來模擬細胞膜與膜蛋白(membrane protein)間交互作用之系統模式，包含細胞膜的滲透性、細胞膜的融合以及細胞膜與蛋白質的反應[2-4]。此外，也因為微脂粒(liposome)的特殊中空球體構造，在微脂粒脂雙層的結構中，它可保留疏水性藥物；其內部水相區中，可包覆水溶性藥物。另外，也由於微脂粒為天然物質所構成，具有良好的生物相容性(compatible)及

生物可分解性(biodegradable)，所以顯示出微脂粒在藥物輸送方面具有很大之應用潛能，特別是被應用於作控制釋放的載體(carriers)。除此之外，微脂粒在癌症藥物之應用上，由於微脂粒的包覆(癌症藥物)，除了可降低癌症藥物對正常細胞之毒性，更由於其特殊胞器構造可提高效率的將包覆物質運送到特定的位置上，以達到最佳療效，由此可知，微脂粒包覆抗癌藥物具有很大之潛能暨發展性。然而，雖說微脂粒有如此多之優點，但是，微脂粒無論是在體內(in vivo)或體外(in vitro)皆仍然存在著穩定性的問題，因而使微脂粒之發展受到了一定之限制，因此為了提高微脂粒之應用價值，提昇微脂粒之穩定性便顯得非常重要。

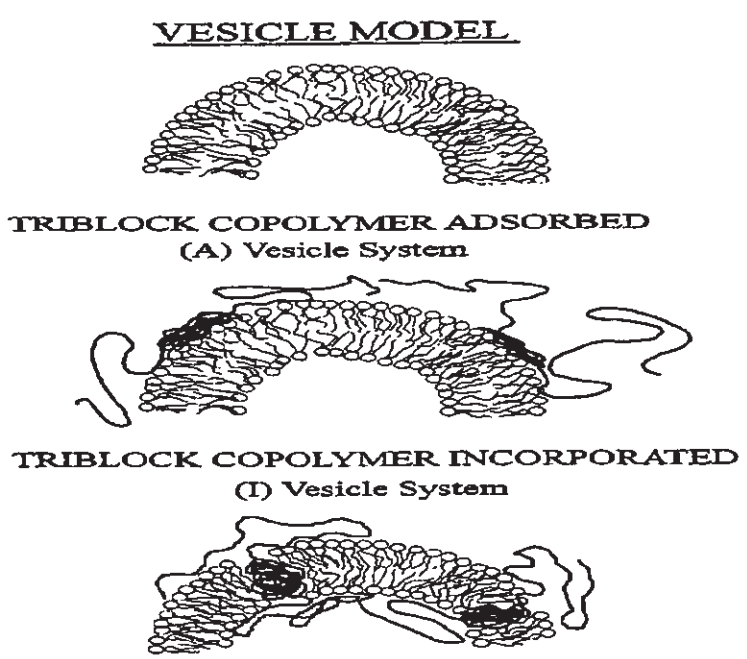
談及微脂粒的穩定性廣義上大致可分三方面來探討：物理穩定性(physical stability)、化學穩定性(chemical stability)及生物穩定性(biological stability)等。物理穩定性包含了微脂粒之聚集(aggregation)與融合(fusion)等行為；化學穩定性包含了磷脂質脂肪酸鏈之氧化(oxidation)與水解(hydrolysis)；生物穩定性則是指微脂粒與血液中的物質或細胞間之反應行為。根據過去文獻表示，為了提昇微脂粒之穩定性，在微脂粒改質方面，已陸續發展出立體穩定型微脂粒(sterically stabilized liposome)[5,6]、氟化物添加型微脂粒(fluorinated liposome)[7,8]及界面活性劑添加型微脂粒[9]...等等。其中立體型微脂粒**(sterically liposome)**由於相較傳統微脂粒具有更好之物理及生物穩定性，目前在應用上已廣為研究學者或業界使用。

微脂粒表面修飾最常見的是以高分子添加物來對微脂粒表面修飾，修飾材料大致可分兩大類：一為人工合成之高分子，例如：PEO、PEG ；另一為生物性高分子例如：多醣類(葡萄聚醣、澱粉黏膠質)及幾丁聚醣[10]...等等。修飾之分類又可分兩大類(脂雙層表面吸附以及嵌入脂雙層)，吸附(adsorption)式[圖一]，高分子大多以靜電作用力或親疏水作用力吸附在微脂粒子表面予以保護微脂粒；接枝嵌入式[圖二]，高分子一端會嵌入膠體粒子，另一端會懸浮在膠體粒子表面上形成所謂之立體型微脂粒。針對立體型微脂粒過去最常被廣泛應用之材料例如PEG-lipid、PEO-lipid [11-13]及三團聯共聚物(tri-block copolymer)[14]...等等。立

體型微脂粒之表面由於存在著柔軟(flexibility)的親水鏈，可以避免蛋白質吸附或與細胞直接觸、反應而被體內的免疫系統所移除，因此有較好的生物穩定性。



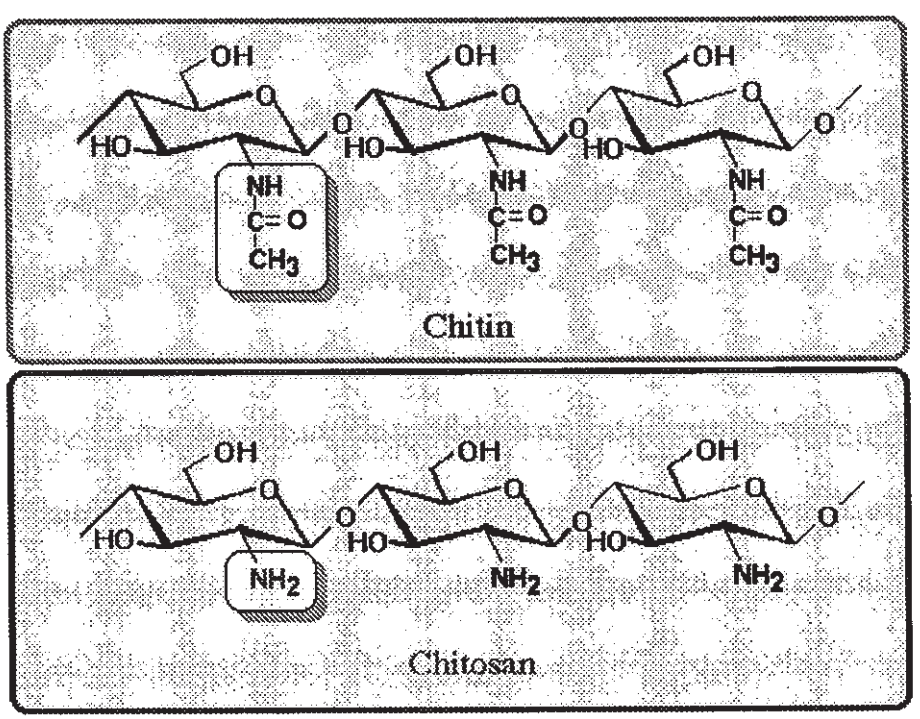
［圖一］高分子與膠體粒子之間的相互作用圖-吸附



［圖二］三團聯共聚物嵌入微脂粒後的結構

幾丁聚醣(chitosan)又稱殼醣素，是幾丁質(Chitin)經由不同程度的脫乙醯基反應而得到的產物，它是以N-乙醯葡萄糖胺(N-acetyl-D-glucosamin)與N-葡萄糖胺(N-D-glucosamin)為結構單元的共聚合體，而N-葡萄糖胺結構單元在聚合物中

的含量通常高於 60% 以上。幾丁聚醣 (chitosan) 的正式名稱 poly(1,4-β-D-glucopyranosamine)或 β-1,4-poly-glucosamine，是一種類似纖維素的直鏈狀聚合物，相較於幾丁質只溶於強酸之特性，幾丁聚醣只要低濃度之有機酸就可以加以溶解，因此大大提高其在各方面的應用，其中甲酸是幾丁聚醣的最佳溶劑，可溶解 0.2~100%的幾丁聚醣，醋酸則常被選為幾丁聚醣的標準溶劑。幾丁聚醣的去乙醯基程度(degree of deacetylation)一般以 70%~90%最為常見，當去乙醯程度越高，材料越容易溶解於水中，主鏈旁的氨基也就越多，因此，當幾丁聚醣在酸性的環境下將會被質子化而形成具正電荷 NH_3^+的官能基[64]；氨基越多，所帶正電荷就越多，界面電位愈高。此外，所謂低分子量水溶性幾丁聚醣，是指將分子量一百萬以上的高分子酸溶性幾丁聚醣經單體切割使之成為分子量 5000 以下的產物，其物理特性可於中性環境下溶解於水中；在本研究所是使用的低分子量水溶性幾丁聚醣，幾丁聚醣是由絲瓜萃取而來再經過特殊水解酵素酶分解成平均分子量 2000 左右之小單體鏈狀物，經本研究之初期結果證實此低分子量之幾丁聚醣在中性溶液下，界面電位量測為一帶負電性。



Chitin 及 Chitosan 結構比較圖

[研究動機]

一般說來，以生物性高分子幾丁聚醣修飾(吸附)微脂粒的表面，特別針對大分子量且非水溶性的幾丁聚醣，在過去研究文獻中[10,15]指出，大分子量且非水溶性的幾丁聚醣必需溶解在酸性溶液下才可吸附在帶負帶的微脂粒表面；在本研究中，我們將率先使用新改質的**低分子量水溶性幾丁聚醣(分子量約2000)**先行接枝於脂質分子後再與以嵌入微脂粒中修飾成立體式微脂粒，由於此材料在中性溶液下即可帶電(功能性較PEG_{2000}高分子好，因為PEG_{2000}高分子不帶電)，期望利用此新材料(低分子量水溶性幾丁聚醣(分子量約2000)) 修飾改質微脂粒的表面形成所謂之**Chitosan-steal-liposome**。除此之外，我們也將討論**Chitosan**之添加對於微脂粒之物理穩定度之影響**(比較 Chitosan-steal-liposome 與 liposome 之物理穩定度)**

整個研究工作，大致包括了下列兩大項:

[第一大項]: Chitosan-steal-liposome 之製備以及Chitosan與微脂粒之交互作用機轉

論及微脂粒之交互作用，最為多數研究學者所接受之模型為微脂粒之聚集及融合行為。在微脂粒懸浮液中，由於粒子間之碰撞，容易導致聚集的發生，當微脂粒聚集的情形發生伴而有可能產生不可逆的融合。一般說來，微脂粒融合現象的發生必須包含下列幾個步驟[17,18](圖)所示：

1.微脂粒粒子必須相互接近而發生聚集。

2.微脂粒粒子接觸位置(the site of contact)發生不穩定，產生膜缺陷，可以當作晶核形成局部脂質的混合(mix)。

3.不穩定區域擴展分隔成兩個粒子或發展成一完全混合之大粒子。

在融合過程中會改變微脂粒脂雙層結構的排列，而產生逆微胞(reverse

micelle)、脂質粒子(lipidic particle)或逆圓柱(reverse cylinder)的中間結構。因此，一般認為在融合過程中會造成部分包覆物質的漏失。因此，可以確定微脂粒的融合行為首先應發生聚集。

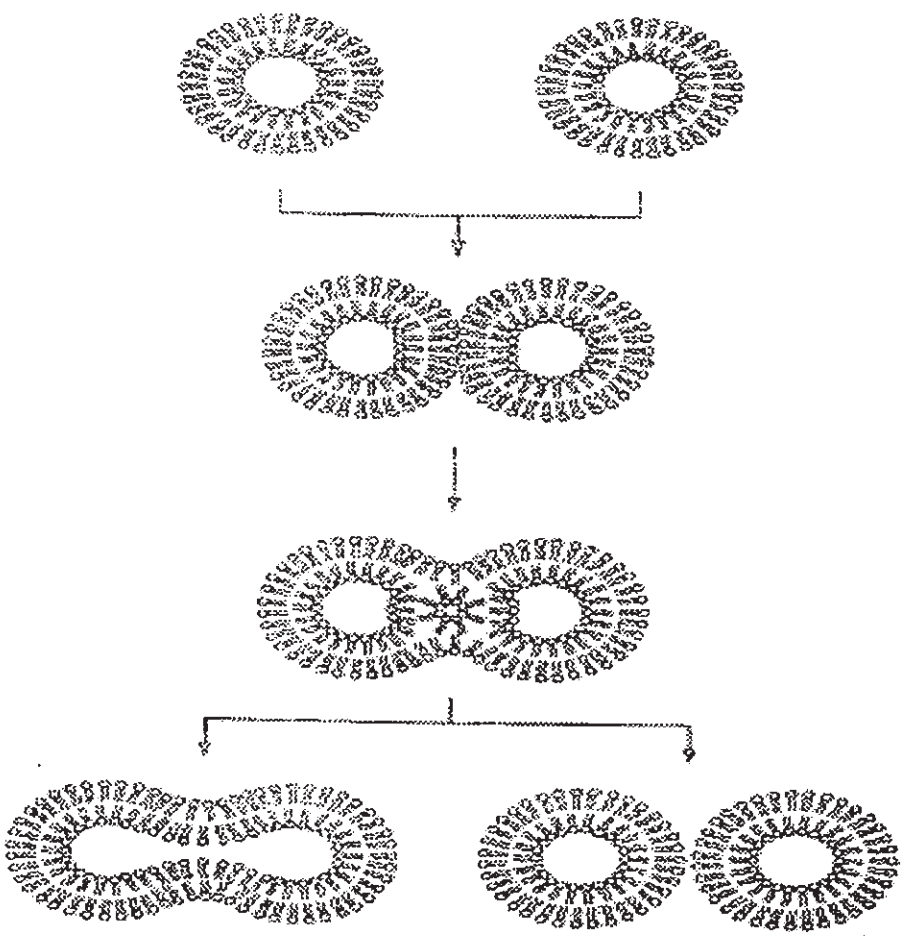


圖:微脂粒聚集融合機轉圖

更進一步說到微脂粒之聚集，微脂粒粒子間的作用力是影響微脂粒聚集與融合的主要因子，一般說來，針對微脂粒粒子間的作用力大致上可以分為: 凡得瓦引力(van der Waals force)、靜電作用斥力(electrostatic force)、水合斥力(hydration force)、立體作用斥力(steric force) [19]…等等。根據過去研究文獻證明，存在微脂粒粒子間之交互作用斥力愈大，微脂粒之聚集現象愈不明顯，有助於提昇微脂粒之物理穩定度。也因此，從1980年代至今，微脂粒之發展在1990年代以後普遍都已會在微脂粒之表面做一接枝形成所謂立體屏蔽效應已增加物

理穩定度。

微脂粒融合，除了微脂粒粒子間的作用力因子外，微脂粒脂雙層之結構穩定度也扮演著一重要因素。關於微脂粒脂雙層之結構，最常被論及之因子就是微脂粒之相轉移溫度，當微脂粒脂雙層之相轉移溫度升高將會降低脂雙層之流動性，有助於提高微脂粒之物理穩定度。因此本研究將針對**Chitosan-steal-liposome**做一系列之探討包括:

1.量測**Chitosan** 吸附微脂粒後之界面電位，由界面電位之變化，探討微脂粒與幾丁聚醣之交互作用機制。

2.利用濁度計量測微脂粒懸浮液之濁度，其觀測幾丁聚醣對微脂粒物理穩定性(聚集)的影響。

3.利用DSC量測不同組成微脂粒的相轉移溫度，探討幾丁聚醣之添加對微脂粒脂雙層排列之影響。

4.量測不同組成配方的微脂粒，在不同儲存溫度下觀測其粒徑(隨時間)之變化，藉以說明**Chitosan**改質對於微脂粒之物理穩定性。

[第二大項]: Chitosan-steal-liposome包覆Cantharidine之研究

1.不同組成之微脂粒，包覆**Cantharidine**後於不同儲存溫度下，其粒徑及藥物滲漏隨時間變化之情形。

2.利用 cone/plate 流變儀所生成之流場剪應力，測試剪應力對微脂粒粒徑及包覆物包覆 **Cantharidine** 之滲漏之影響，並進一步討論微脂粒脂雙層結構之穩定度。

實驗細節大致如下:

[A] 微脂粒(**Chitosan-steal-liposome**)的製備

微脂粒的製備方式有許多種，包括了(1)機械應力法 (2) 溶劑分散法及清潔劑溶解法(3) 反相蒸發法。在本研究中我們所採用之方法為薄膜擠壓法，其工作原理是將脂質膜水合溶液(MLV-liposome) 利用外壓(一般使用氮氣) 擠壓使

其通過一特定粒徑大小之高分子過濾膜製備而得，如此反覆操作數次，可使微脂粒粒徑分佈達到一均勻度及大小。製備步驟簡單描述如下：

1.先將所選擇的配方物質(lipid，cholesterol....)置於磨口燒瓶中，加入氯仿，使配方完全溶解並呈現均勻液相。然後，將磨口燒瓶接上真空濃縮儀，並水浴將溫度控制在40℃下將溶劑抽乾，使配方物質在瓶壁上形成一均勻薄膜。

2.加入緩衝溶液，以水浴式超音波振盪器振盪，使脂質膜完全由瓶壁脫落而進入溶液中，形成多層微泡(MLVs)溶液。

3.利用擠壓器擠壓五次，製備單層小顆之微脂粒溶液(100 nm)，裝入樣品瓶中。

4. 加入幾丁聚醣於微脂粒溶液中並加入磁石攪拌，並持續6小時以上。

[B]包覆 **Cantharidine** 之微脂粒製備

1.步驟同上述微脂粒之製備，唯獨在步驟1，同時將療徼舒給加入，使配方與**Cantharidine**完全溶解並呈現均勻液相。

[C]界面電位的測量

1.將粒徑儀電源打開暖機至少20分鐘，使光源穩定。將微脂粒溶液置於乾淨的四面透明的比色槽中，再以去離子水稀釋，並避免容氣內有氣泡產生。

2.將四面透明的比色槽放入儀器中，插入電極，設定參數(包括了黏度、折射率等)進行測量。

3. 每個樣品測量30次，取其平均值。

[D]粒徑的測量

1.將粒徑儀電源打開暖機至少20分鐘，使光源穩定。將微脂粒溶液置於乾淨的四面透明的比色槽中，再以緩衝溶液稀釋，並避免容氣內有氣泡產生。

2. 將四面透明的比色槽放入儀器中，設定參數(包括了黏度、折射率等)進行測量。

4. 每個樣品測量10次，取其平均值。

[E] 濁度的測量

1. 將電源打開暖機20分鐘。

2. 首先，放入空白樣品歸零。再取出微脂粒溶液置於乾淨的兩面透光比色槽中，並避免比色槽中產生氣泡。

3. 將兩面透光的比色槽放入儀器中進行測量，並記錄數值。

[F]DSC實驗

1.將微脂粒溶液放入試樣容器(pan)中，以密封試樣容器的機器將試樣容器密封，避免液體外漏。將待測樣品放在爐子上後將上蓋密封，設定掃描速率(scanning rate)、掃描溫度範圍(scanning range)等參數。

2.待系統平衡後啟動實驗。儀器會依照所設定的實驗方法進行相轉移溫度的量測，並記錄其熱量變化。

3.實驗結束後分析圖形可得相轉移溫度。

[G]包覆效率的測定

1.取1ml的微脂粒溶液置於小離心管中，以高速離心機離心3分鐘。

2.離心後，取其上層液0.5ml置於磨口燒瓶中並以真空濃縮機將水分抽乾。

3. 待蒸乾後加入1ml的甲醇溶解之。

4. 以0.22μm的過濾膜過濾後，利用HPLC定量療徽舒的濃度。

[H]剪應力實驗

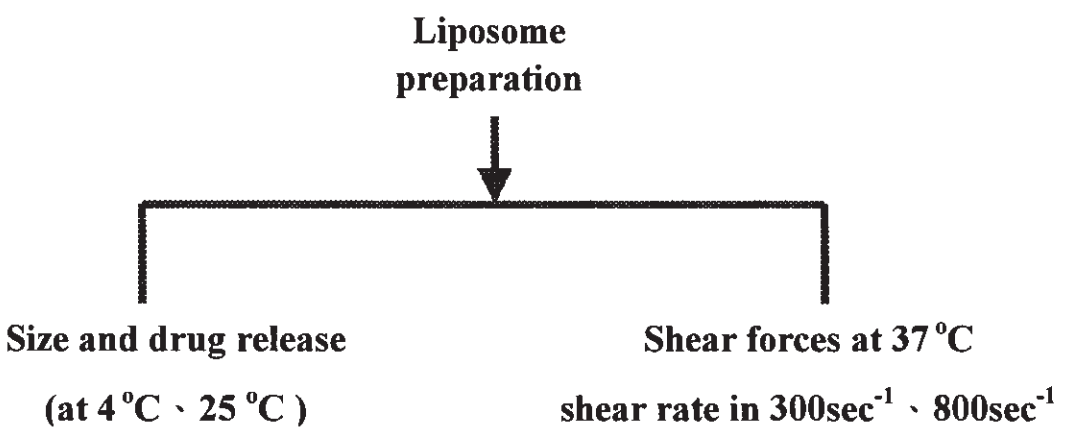
1.將微脂粒懸浮液取4ml放置於黏度儀槽中(cone/plate)，調整好cone以及plate之感應距離後，調整欲操作之剪切率使其作流場試驗。

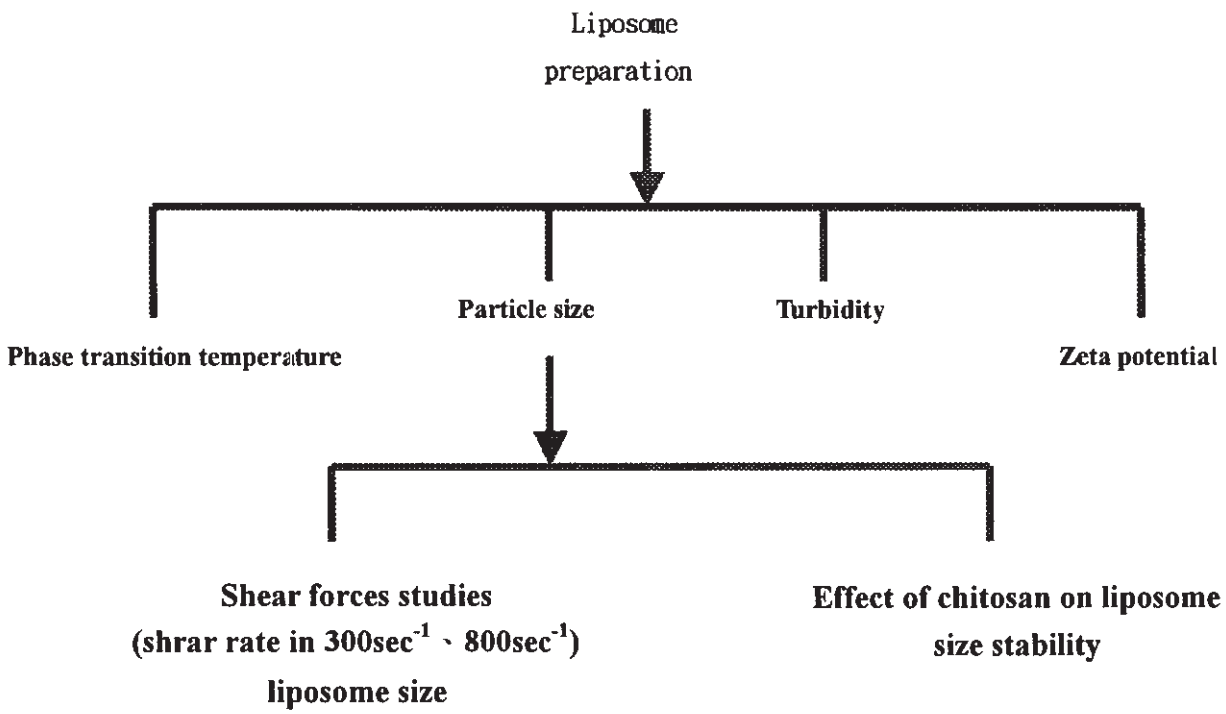
2.本系統之流場剪應力實驗系統是將待測之微脂粒懸浮液置放於cone/plate之黏

度儀中，以特定之剪切率(300sec^{-1}及800sec^{-1})對其shear 0、5、10、15及30分鐘觀測微脂粒懸浮液於流場shear之後其隨培養時間微脂粒粒徑與滲漏率之變化情形。

3. 樣本以粒徑儀分析微脂粒粒徑及 HPLC 分析療徹舒之釋放量。

［實驗流程圖］




Liposome
preparation
Particle size
Turbidity
Phase transition temperature
Zeta potential
Shear forces studies
(shrar rate in 300sec-1 、 800sec-1)
liposome size
Effect of chitosan on liposome
size stability

二 實驗結果

1. egg PC：vitamin E：cholesterol：SA＝16：4：4：1（莫耳比）製備而成的微脂粒，在系統酸鹼值為 pH＝7.4（Tris buffer）環境下量測，微脂粒脂雙層表面帶正電，顯示微脂粒粒子間具有微弱的靜電斥力。
2. 添加不同含量的幾丁聚醣於微脂粒溶液中，會使得微脂粒的界面電位正的越少（由 24mV 降低到 13mV），並且對微脂粒的初始粒徑會有增大的現象；同時微脂粒界面電位與初始粒徑，在添加 5wt% 幾丁聚醣後，沒有持續明顯的變化。
3. 在微脂粒溶液中，當幾丁聚醣的量添加大於 1wt% 時，在 25℃儲存溫度下，會使微脂粒粒徑變大，造成所謂融合（fusion）的現象。
4. 由濁度實驗中，在微脂粒溶液中，添加幾丁聚醣會使微脂粒懸浮液濁度上升。
5. 至於在分子層面的影響，由 DSC 實驗添加幾丁聚醣病不會影響微脂粒之相轉移溫度。
6. 在 25℃下，添加幾丁聚醣的微脂粒對剪應力（外力）流場的承受度並無明顯影響。
7. 關於斑蝥素滲漏實驗，在 25℃及 4℃儲存溫度下，添加幾丁聚醣（1wt% ）時，並不會影響微脂粒的粒徑與滲漏速度。
8. 在 37℃及剪應力流場（$3000sec^{-1}$、$800sec^{-1}$）環境下，在包覆斑蝥素的微脂粒溶液中，表面修飾型微脂粒，其微脂粒的粒徑及滲漏速度與傳統型微脂粒無明顯差別；不過觀測不同剪應力流場對傳統型與表面修飾型微脂粒的影響，兩者（傳統型與表面修飾型微脂粒）皆顯示在高剪切率（$800sec^{-1}$）的滲漏速度會大於低剪切率（$3000sec^{-1}$）。
9. 以包覆率觀點微脂粒配方 egg PC：vitamin E：cholesterol：SA＝16：4：4：1（莫耳比）之包覆率最高可達 31%。

三 文獻參考

1. A. D. Bangham, M. M. Standish and J. C. Watkins, "Diffusion of Univalent Ions Across the Lamellae of Swollen Phosopholipids", Journal of Molecular Biology, 13, 238-252(1965)

2. F. Frezard and A. Garniersuillerot, "Permeability of Lipid Bilayer to Anthracyline Derivatives–Role of the Bilayer Composition and of the Temperature", Biochimica et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism, 1389, 13-22(1998)

3. R. Chang, S. Nir and F. R. Poulain, "Analysis of Binding and Membrane Destabilization of Phospholipid-Membranes by Surfactant Apoprotein-B", Biochimica et Biophysica Acta–Biomembranes, 1371, 254-264(1998)

4. S. C Semple, A. Chonn and P. R. Cullis, "Interactions of Liposomes and Lipid-Based Carrier Systems with Blood Proteins-Relation to Clearance Behavior in Vivo", Advanced Drug Delivery Reviews, 32, 3-17(1998)

5. T. K. Bronich, S. V. Solomatin, A. A. Yaroslavov, A. Eisenberg, V. A. Kabanov and A.V. Kabanov, "Steric Stabilization of Negatively Charged Liposomes by Cationic Graft Copolymer", Langmuir, 16, 4877 -4881(2000)

6. P. Crosasso, M. Ceruti, P. Brusa, S. Arpicco, F. Dosio and L. Cattel, "Preparation, Characterization and Properties of Sterically Stabilized Paclitaxel-Containing Liposomes", Journal of Controlled Release, 63,19-30(2000)]

7. L. Trevino, F. Frezard, J. P. Roll, M. Postel and J. G. Riess, "Novel Liposome Systems Based on the Incorporation of (Perfluoroalkyl)Alkenes(FmHnE) into the Bilayer of Phospholipid Liposomes", Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 88, 223-233(1994)

8. F. Frezard, C. Santaella, P. Vierling and J. G. Riess, "Fluorinated Phospholipid-Based Vesicles as Potential Drug Carriers:Encapsulation/

Sustaining of Drugs and Stability in Human Serum",Artificial Cells, Blood Substitutes, and Immobilization Biotechnology, 22, 1403-1408 (1994)

9. L. M. Tasi, D. Z. Liu and W. Y. Chen, "Microcalorimetric Investigation of the Interaction of Polysorbate Surfactants with Unilamellar Phosphatidylcholines Liposomes", Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 213, 7-14(2003)

10. O. Shuichi and K. Nakamura, "Effects of Complexation Between Liposome and Poly(malic acid) on Aggregation and Leakage Behaviour", Biomaterials, 21, 867-876(2000)

11. K. B. Frank, P. Tang, Y. Xu and H. Leaf, "Effect of Polyethyleneglycol Chain Length and Phospholipid Acyl Chain Composition on the Interaction of Polyethylaneglycol-Phospholipid Conjugates with Phospholipid : Implications in Liposomal Drug Delivery", Pharmaceutical Research, 13, 5, 710-717(1996)

12. D. Needham, T. J. Mcintosh and D. D. Lasic, "Repulsive Interactions and Mechanical Stability of Polymer-grafted Lipid Membranes", Biochimica et Biophysica Acta, 1108, 40-48(1992)

13. A. Yoshida, K. Hashizaki, H. Yamauchi, H. Sakai, S. Yokoyama, and M. Abe, "Effect of Lipid with Covalently Attached Poly (ethyleneglycol) on the Surface Properties of Liposomal Bilayer Membranes", Langmuir, 15, 2333-2337(1999)

14. K. Kostarelos, T. F. Tadros and P. F. Luckham, "Physical Conjugation of (Tri-) Block Copolymers to Liposomes Toward the Construction of Sterically Stabilized Vesicle Systems", Langmuir, 15, 369-376(1999)

15. J. Filipovic-Grcic, N. Skalko-Basnet and I. Jalsenjak, "Mucoadhesive Chitosan- Coated Liposomes : Characteristics and Stability", Journal of Microencapsulation, 18, 3-12(2001)

16. Lee, W. S., Chen, R. J., Wang, Y. J., Tseng, H., Jeng, J. H., Lin, S. Y., Liang, Y. C., Chen, C. H., Lin, C. H., Lin, J. K., Ho, P. Y., Chu, J. S., Ho, W. L., Chen, L. C., and Ho, Y. S. In vitro and in vivo studies of the anticancer

action of terbinafine in human cancer cell lines: G0/G1 p53-associated cell cycle arrest. Int J Cancer, 106: 125-137, 2003.

17. H. Minami, T. Inoue and R. Simozawa, "Beryllium Ion Can Induced the Aggregation of Phosphatidylcholine Vesicles", Langmuir, 12, 3574-3579(1996)

18. J. Israelachvili and H. Wennerstrom, "Hydration of Steric Force Between Amphiphilic Surface", Langmuir, 6, 873-876(1990)。