Article

Zero-Shear Viscosity of Aqueous Solutions of Sodium Hyarulonate: Analysis as Semiflexible Polymer Solutions

Takahiro SATO^{*1}, Shin-ichi YAMAMOTO^{*2}, Toshikazu TAKIGAWA^{*2}, and Toshiro MASUDA^{*2}

^{*1} Department of Macromolecular Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka 560-0043, Japan

^{*2} Department of Material Chemistry, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

Zero-shear viscosities η_0 of aqueous solutions of sodium hyarulonate were compared with the fuzzy-cylinder model theory, a typical theory for semiflexible polymer solutions. Taking into account electrostatic contributions to the chain-stiffness and excluded-volume effect, the theory quantitatively describes the concentration dependence of η_0 at molecular weights lower than 10^6 . On the other hand, the theory predicts too strong concentration dependence of η_0 at molecular weights higher than 10^6 at high polymer concentrations. These results indicate that the flexible-chain dynamics (e.g., reptation motion), neglected in the fuzzy-cylinder model theory, are not important in solution viscosity for lower molecular weight sodium hyarulonate, but become important with increasing the molecular weight.

Key Words : Sodium hyarulonate / Zero-shear viscosity / Semiflexible polymer / Fuzzy-cylinder model theory

ヒアルロン酸ナトリウム水溶液のゼロずり粘度：半屈曲性高分子溶液としての解析

佐藤 尚弘^{*1}，山本 真一^{*2}，瀧川 敏算^{*2}，升田 利史郎^{*2}

(原稿受理：2001年6月11日)

1. 緒 言

ヒアルロン酸は生体内で関節の潤滑など、重要な生理作用を有する電解質多糖で、医薬や化粧品などへの応用が期待されている。¹⁾ このような重要性のために、その水溶液のレオロジー的性質には多くの関心が寄せられており、これまでに数多くのレオロジー的研究がなされている。^{1,2)}

水溶液中でのヒアルロン酸の持続長 q は、イオン強度が十分高いときには、4 nm程度で³⁻⁵⁾、典型的な半屈曲性高分子、たとえばポリイソシアナート誘導体($q \cong 20 \sim 40$ nm)やセルロース誘導体($q \cong 10$ nm)⁶⁾、と比較すると高分子鎖の剛直性は低い、典型的な屈曲性高分子鎖($q \cong 1$ nm)⁷⁾より剛直である。さらに、一般に高分子電解質の場合、水溶液中のイオン強度を減少させていくと、分子内の静電反発力によって高分子鎖の剛直性が増大することが知られている。ヒアルロン酸ナトリウムの場合には、則末ら³⁻⁵⁾によってNaCl水溶液中(25°C)での分子形態が詳細に調べられており、 q 値はTable Iに示すようにイオン強度 I の減少にともなって増大する。イオン強度が0.01 M程度以下になると、ヒアルロン酸ナトリウムの q は典型的な半屈曲性高分子のそれと同程度となっている。

また同時に、高分子電解質分子内の静電相互作用は鎖に

Table I Persistence length q and the excluded-volume strength B of sodium hyarulonate in aqueous sodium chloride (NaCl) at 25 °C, as functions of the ionic strength I (Tsutsumi and Norisuye⁵⁾).

I/M	q/nm	B/nm
0.005	9.7	19
0.0067	8.5	17
0.01	7.4	13
0.02	6.0	9.0
0.05	5.0	7.0
0.1	4.8	4.8
0.2	4.2	4.0
0.5	4.1	2.8
1	4.0	2.3
2.5	4.0	1.6

沿って遠く離れたモノマー単位間にも働き、これは分子内排除体積効果の増大をもたらす。Table Iには、ヒアルロン酸ナトリウムの排除体積強度パラメータ B のイオン強度依存性も同時に示してある。

以上のように、ヒアルロン酸は水溶液中で典型的な屈曲性高分子とは異なった分子形態を有しており、水溶液のレオロジー的性質にも、鎖の剛直性(および強い排除体積効果)を考慮する必要があると考えられる。実際、Fouissacら²⁾はヒアルロン酸水溶液のゼロずり粘度の分子量依存性が通常の屈曲

^{*1} 大阪大学大学院理学研究科

〒 560-0043 大阪府豊中市待兼山町 1-1

^{*2} 京都大学大学院工学研究科

〒 606-8501 京都府京都市左京区吉田本町

性高分子の濃厚溶液系よりも強いことを見出し、これがヒアルロン酸鎖の剛直性に依るとしている。しかしながら、彼等はヒアルロン酸濃厚水溶液のレオロジー的性質における鎖の剛直性の効果を定量的には議論していない。

そこで本研究では、この系を半屈曲性高分子溶液と見なし、最近行われたヒアルロン酸ナトリウム水溶液に対するゼロずり粘度の実験結果を、半屈曲性高分子溶液に対する代表的な理論であるファジー円筒モデルに基づく理論と比較した。この理論は、これまでの研究により、種々の剛直・半屈曲性高分子溶液のゼロずり粘度をほぼ定量的に記述できることが知られており^{6,8)}、以下ではヒアルロン酸水溶液系への同理論の適用性について吟味し、この系のレオロジー的性質への高分子鎖の剛直性の効果を定量的に議論する。

2. ファジー円筒モデル理論

この理論の詳細については、文献6, 8にすでに述べられている。ここでは同理論を高分子電解質溶液に適用する際の注意点を中心に述べる。この理論では、溶液中の各高分子鎖を、分子形態に関して平均化して得られる円筒対称のセグメント分布（ファジー円筒モデル）で置き換え、高分子の全体運動について議論する。各高分子鎖の内部運動については、陽には議論しない。

ファジー円筒モデルの有効な長さ L_e と有効な太さ d_e は次式で与えられるとする：

$$L_e = \langle R^2 \rangle^{1/2}, d_e = \left(\langle H^2 \rangle + d^2 \right)^{1/2} \quad (1)$$

ここで、 R^2 と H^2 はそれぞれ高分子鎖の自乗平均両末端間距離および末端間軸と鎖の midpoint 間の自乗平均距離を表わし、 d は高分子鎖の実直径を表わす。平均量 R^2 と H^2 は、高分子鎖の持続長 q と全長 L （あるいは $N \equiv L/2q$ で定義される Kuhn の統計セグメント数）、および排除体積強度パラメータ B を用いて、次式より計算できる。

$$\langle R^2 \rangle = \alpha_R^2 \cdot (2q)^2 \left[N - \frac{1}{2}(1 - e^{-2N}) \right] \quad (2)$$

$$\langle H^2 \rangle = p_e^{-2} \langle R^2 \rangle \quad (3)$$

上式中、 α_R は排除体積効果による末端間膨張因子で、 N および B の関数であり⁹⁾ p_e は高分子鎖の有効軸比を表わし、 N の関数として与えられている⁶⁾ (p_e に対する排除体積効果は考えない)。高分子電解質の場合、 q と B はイオン強度 I によって変化し、かつ高分子電解質自身が溶液の I に寄与するので L_e と d_e は高分子電解質の濃度に依存することに注意する必要がある。

高分子の質量濃度が c である溶液のゼロずり粘度 η_0 は次式で与えられる。

$$\frac{\eta_0}{\eta^{(S)}} = 1 + [\eta]c(1 + K_{HI}[\eta]c) \left[1 + \frac{3}{4} \chi^2 \left(\frac{\hat{D}_{r0}}{D_r} - 1 \right) \right] \quad (4)$$

ここで、 $\eta^{(S)}$ は溶媒の粘性係数、 $[\eta]$ は固有粘度、 γ と χ は計算可能な流体力学的パラメータ、そして K_{HI} は高分子間の流体力学的相互作用の強さを表す係数である。また D_r は溶液中での

ファジー円筒の回転拡散係数、 $\hat{D}_{r0}$ は高分子間のからみ合い相互作用がないと仮定したときの D_r を表わす。もしも、高分子鎖の形態がその濃度とともに変化するならば、式(4)中の $[\eta]$ には無限希釈状態での値ではなく、各濃度における高分子鎖の形態に対応した（仮想的な）値を用いる必要がある。有限濃度での $[\eta]$ は、 L , q , および B の値を用いて、山川ら⁹⁾のみみず鎖に対する固有粘度の理論から計算することができる。

からみ合い効果を受けたファジー円筒の D_r は、次式より計算される。

$$\frac{D_r}{\hat{D}_{r0}} = \left[1 + \frac{L_e^4}{90L} c' f_r \left(d_e / L_e \right) \left(\frac{F_{||0} \hat{D}_{||0}}{F_{r0} D_{||}} \right)^{1/2} \right]^{-2} \quad (5)$$

ただし、 c' はファジー円筒の数濃度、 f_r は d_e/L_e の既知関数、 $F_{||0}$ と F_{r0} は計算可能な流体力学的パラメータ、そして $D_{||}/\hat{D}_{||0}$ は分子間の衝突によるファジー円筒の縦方向の並進拡散の遅延化を表わす因子で、空孔理論に基づき次式より計算される。

$$D_{||}/\hat{D}_{||0} = \exp(-V_{ex}^* c') \quad (6)$$

式中、 V_{ex}^* は縦方向の拡散が起こるために必要な臨界空孔と障害ファジー円筒との相互排除体積で、臨界空孔とファジー円筒との相似比 λ^* が与えられれば計算できる。これまでの研究より、 λ^* に0.03 ~ 0.12の値を選ぶと実験と理論が良く一致することが知られている。^{6,8)}

粘度式(4)を濃度展開すると、 c の2次の係数よりHuggins係数 k' が得られる。非電解質高分子の場合には、この k' の理論式と実測の k' を比較することにより、式(4)中の k'_{HI} を求めることができる。これに対して、イオン強度の低い高分子電解質溶液の場合には、希薄領域で粘度の濃度依存性に異常性が現れ、 $[\eta]$ および k' が実測困難となる。（また、いわゆる電気粘性効果に起因する項が新たに k' に加わり、 k'_{HI} の項を抽出することが難しい。）

高分子間の流体力学的相互作用は、溶液のイオン強度には直接的にはそれほど依存しないと考えられる。そこで、イオン強度が十分高く、高分子間の静電相互作用がほぼ完全に遮蔽されている溶液について、非電解質高分子と同じ方法で k'_{HI} を求め、その値をそのままイオン強度の低い溶液にも用いることにする。

3. 実験および測定試料の特性化

レオロジー測定には、電気化学工業社より提供されたヒアルロン酸ナトリウム試料（DHAS1）およびそれを窒素雰囲気下70°Cで67 h ~ 490 h熱処理し、分子量を低下させた3試料（DHAS2, DHAS3, DHAS4）を用いた。各試料の0.2 M NaCl水溶液中25°Cあるいは30°Cでの固有粘度 $[\eta]$ およびその結果から見積もった粘度平均分子量 M_v をTable IIに掲げる。ただし、DHAS1とDHAS2の粘度測定には、4球蛇管式低ずり速度毛细管粘度計を用いてゼロずり速度での $[\eta]$ を求め、 M_v の見積もりには25°Cにおける $[\eta]$ と分子量の関係式⁵⁾を用いた。

各試料を純水に溶かし、質量濃度 c が 1×10^{-4} から 5×10^{-2} g/cm³までの溶液を調製し、温度35°Cで動的粘弾性測定を行っ

Table II Molecular characteristics of sodium hyarulonate samples used for viscometry.

sample	DHAS1	DHAS2	DHAS3	DHAS4
$[\eta]/\text{cm}^3\text{g}^{-1}$ ^a	3680	2260	1570	970
$M_v/10^6$ ^b	2.35	1.19	0.76	0.44
L/nm ^c	5900	3000	1900	1100
N (0.002 g/cm ³) ^d	300	150	98	57
N (0.005 g/cm ³) ^d	430	220	140	80
N (0.01 g/cm ³) ^d	520	260	170	96
N (0.02 g/cm ³) ^d	590	300	190	110
N (0.05 g/cm ³) ^d	660	330	210	120

^a Intrinsic viscosity in 0.2 M aqueous NaCl at 25 °C (for DHAS1 and DHAS2) or 30 °C (for DHAS3 and DHAS4).

^b Viscosity-average molecular weight determined from the relation between $[\eta]$ and molecular weight obtained by Tsutsumi and Norisuye⁵.

^c Chain contour length estimated with the molar mass per unit contour length $M_L = 400$ nm⁻¹.

^d Number of Kuhn's statistical segments at the polymer concentration indicated in the parentheses, estimated from q listed in Table I and eq (7).

た.高濃度溶液の測定には, ReoLogica Instrument 社製 DAR100 を,低濃度溶液については Vilastic Science 社製キャピラリー型 レオメータ Vilastic3 を使用した.測定角周波数 ω の範囲は 10^{-2} から 10^2 s⁻¹ までで,ゼロずり粘度 η_0 は損失弾性率を ω で割った量をゼロ周波数に外挿して求めた.¹⁰⁾

ヒアルロン酸ナトリウムの単位経路長当りの分子量 M_L は,イオン強度に依らず,400 nm⁻¹ であることが知られている.³⁻⁵⁾ この M_L 値と Table II に掲げた M_v より見積もられる各試料の経路長 L を Table II の第4行目に示す.さらにこの L と持続長 q より, Kuhn の統計セグメント数 N を計算することができる.ただし, Table I に示したように, q は水溶液のイオン強度に依存する.レオロジー測定を行った無塩系では,ヒアルロン酸ナトリウム自身のみがイオン強度に寄与する.ヒアルロン酸はモノマー単位当り1個の解離基を有しており,これが低分子塩と同じように溶液のイオン強度 I に寄与すると見なすと,次式より各高分子質量濃度 c (g/cm³) における I を計算できる.

$$I = 1000c/M_0 \quad (7)$$

ここで, M_0 はヒアルロン酸ナトリウムのモノマー分子量(=401)で, I は体積モル濃度 (M) の単位で表すものとし,ナトリウム塩型のヒアルロン酸は完全解離しているとした.

Table II の第5行目以降には,いくつかの高分子濃度の無塩水溶液中における各測定試料の N の値を掲げてある.計算には,式(7)より求めた I における q の値を Table I に示した文献値を内挿して求めて用いた.ただし,レオロジー測定温度(35°C)と文献値の温度(25°C)の違いは無視した.

4. 結果と考察

ヒアルロン酸ナトリウム4試料に対するゼロずり粘度 η_0 対高分子質量濃度 c の両対数プロットを Fig.1 中の丸印および四角印で示す.いずれの試料についても,データ点は下に凸の曲線に従っており,高濃度領域での曲線の傾きはいずれも約3.8であった.また, Fig.1 に示したデータから,適当に選んだいくつかの濃度における η_0 を分子量に対して両対数プロットした結果を Fig.2 の丸印および四角印で示す.濃度が0.001 g/cm³ におけるデータ点(白四角)は傾きが1.2の直線に,また濃度が0.05 g/cm³ のデータ点(黒丸)は傾きが3.6の直線にほぼ従っている.後者は,からみ合い相互作用の働いた屈曲性高分子の濃厚系に期待される分子量依存性に近い.ただし,中間的な濃度0.01 g/cm³ のデータ点が,傾き4近くの直線に従っているように見える.同様な粘度の強い分子量依存性は,すでに Fouissac ら²⁾ によって同じ高分子濃度の(ただし,0.1 M NaCl を含んだ)ヒアルロン酸水溶液において報告されている.

Fig.1 と2 に示した実験結果を,第2節で述べたファジー円筒モデルに基づく理論と比較する.理論計算に必要なファジー円筒の有効な長さ L_e と太さ d_e の見積もりには, q と B を知る必要がある(式(1)~(3)参照).各高分子濃度でのイオン強度は式(7)より計算され,各イオン強度での q と B は, Table I に示した文献値を内挿することにより求めることができる.ただし, $c < 0.002$ g/cm³ での I は0.005 M より小さくなるが, $I < 0.005$ M での q と B の文献値がないため,この濃度領域での η_0 の計算は行えなかった.また,式(4)中の固有粘度 $[\eta]$ もイオン強度すなわち高分子濃度に依存するが,この値も式(7)より計算された I における $[\eta]$ を文献値⁵⁾ を頼りに見積もることができる.

理論中に含まれる唯一の未知パラメータは,式(6)中の V_{ex}^* に含まれる臨界空孔とファジー円筒との相似比 λ^* である.いまこの値として0.07を選ばると, Fig.1 中の実線で示した理論曲線が得られる.低分子量の2試料に対する η_0 の実験結果は理論線にほぼ従っており,ヒアルロン酸ナトリウム水溶液の粘度挙動がこの分子量においてはファジー円筒に基づく理論に

Fig.1 Concentration dependence of the zero-shear viscosity of aqueous solutions of sodium hyarulonate; solid curves, theoretical curves calculated by the fuzzy-cylinder model theory.

Fig.2 Molecular-weight dependence of the zero-shear viscosity of aqueous solutions of sodium hyaluronate; solid curves, theoretical curves calculated by the fuzzy-cylinder model theory.

よって説明できることを示している。選んだ λ^* の値は、これまでに研究された剛直・半屈曲性高分子溶液系で得られている値(0.03 ~ 0.12)^{6,8)}の中間に位置している。

Fig.1において、高分子量2試料に対する理論線は、実験値を低濃度側では過小評価し、他方高濃度側では過大評価する傾向にある。以前に研究された、ポリ(*n*-ヘキシルイソシアナート)($q = 21 \text{ nm}$)のジクロロメタン溶液の η_0 についても、分子量が非常に高いときには、やはり同様なファジー円筒モデル理論とのずれが見い出されている。¹¹⁾ Table IIからわかるように、高分子量のヒアルロン酸2試料(DHAS1と2)のKuhn統計セグメント数 N は150を超えており、これらのヒアルロン酸分子はむしろガウス鎖と見なし、屈曲性高分子系に対する理論体系(レプテーションモデル等)に基づいて議論されるべきかも知れない。ただし、ここでは屈曲性高分子系に対する理論による解析は行わない。

Fig.2においても、実線はファジー円筒モデル理論による理論線であり、高分子量側で実験データ点とのずれが認められる。中間の濃度である $c = 0.01 \text{ g/cm}^3$ において、理論と実験の一致がかなり良いように見えるが、これはFig.1において、理論線が実験データをちょうど交差する濃度に対応するため、

この特別な濃度において理論の妥当性を示しているわけではない。

5. 結 論

生体系において重要な役割を持つヒアルロン酸水溶液のゼロすり粘度を、半屈曲性高分子溶液に対する代表的な理論である、ファジー円筒モデルに基づく理論と比較した。分子量が100万未満のヒアルロン酸試料については、溶液粘度挙動が同理論によって、ほぼ定量的に説明され、理論の妥当性が示された。これに対して、分子量が100万を超えるヒアルロン酸試料の水溶液粘度は、この理論では説明できず、理論で無視されているレプテーション運動のような屈曲性高分子に特有なダイナミックスが重要になることを示唆している。

謝 辞

ヒアルロン酸試料の固有粘度測定に協力していただいた、大阪大学の中江圭介氏に感謝する。なお、本研究は、2001年3月5日開催の関西レオロジー研究会第19回関西地区修士発表会における発表と議論を発端に行われた。

参 考 文 献

- 1) Lapcik L Jr, Lapcik L, Smedt S D, Demeester J, Chabreck P, *Chem Rev*, **98**, 2663 (1998).
- 2) Fouissac E, Milas M, Rinaudo M, *Macromolecules*, **26**, 6945 (1993), and references therein.
- 3) Hayashi K, Tsutsumi K, Nakajima F, Norisuye T, Teramoto A, *Macromolecules*, **28**, 3824 (1995).
- 4) Hayashi K, Tsutsumi K, Norisuye T, Teramoto A, *Polym J*, **28**, 922 (1996).
- 5) Tsutsumi K, Norisuye T, *Polym J*, **30**, 345 (1998).
- 6) Sato T, Teramoto A, *Adv Polym Sci*, **126**, 85 (1996).
- 7) Norisuye T, Fujita H, *Polym J*, **14**, 143 (1982).
- 8) 佐藤尚弘, 日本レオロジー学会誌, **27**, 205 (1999).
- 9) Yamakawa H, "Helical Wormlike Chains in Polymer Solutions," Springer, Berlin & Heidelberg (1997).
- 10) Yamamoto S, Takigawa T, Masuda T, in preparation.
- 11) Sato T, Ohshima A, and Teramoto A, *Macromolecules*, **31**, 3094 (1998).