ゼラチン, コンドロイチン硫酸混合膜の物理化学的研究 (第2報¹⁾) コンドロイチン
硫酸濃度および複合体形成の膨潤におよぼす影響

米勢政勝,^{2a)} 中垣正幸^{2b)}

名古屋市立大学薬学部,^{2a)} 京都大学薬学部^{2b)}

Physico-chemical Studies of the Mixed Membrane composed of Gelatin and
Chondroitin Sulfate. II.¹⁾ Effect of Chondroitin Sulfate Concentration
and of Complex Formation on Swelling

MASAKATSU YONESE^{2a)} and MASAYUKI NAKAGAKI^{2b)}

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University^{2a)} and
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University^{2b)}

(Received August 21, 1974)

Mixed membranes composed of various fractions of gelatin and chondroitinsulfate C (chs) were made insoluble by formaldehyde. The swelling of these in aqueous media were experimented in the range of pH 2.9—7.0. The rate constant (k) of swelling (obtained from the equation of the first-order reaction), the rate of increase in membrane thickness (α_L) and that in membrane radius (α_r) in the initial step of swelling were obtained. With increasing weight fractions of chs (X_{chs}), k increased in the case of pH 5.6 and 4.2, but decreased when pH was 2.9. It was estimated from the analysis of these results that the insoluble complex formation between gelatin and chs occurs and depresses the swelling rate. The swelling of these membranes were anisotropic, and the values of α_L and α_r depended on X_{chs} as well as on pH in a similar behavior as that of k .

膜およびゲルの膨潤に関する研究は古くからなされており、平衡膨潤に関しては Flory³⁾ らが詳細に検討している。高分子電解質からなるゲルの膨潤はゲルの架橋度、解離基の荷電状態および外部溶液のイオン強度などによって影響を受ける。たとえばジビニールベンゼンで架橋したポリメタクリル酸ゲルの平衡膨潤は中和度が大きくなるに従い増加し、0.4—0.5 以上ではほぼ一定値に達する。⁴⁾ またゲル中での分子の配向、相転移などに関連させた膨潤の研究は多い。⁵⁾ しかしながらゲル中で複合体が形成するような系での膨潤はほとんど研究されていない。

前報¹⁾ において、ゼラチン、コンドロイチン硫酸混合膜の膨潤の pH 変化およびその異方性について報告した。本報においてはゼラチンとコンドロイチン硫酸が不溶性複合体を形成する酸性領域の膨潤に注目し、コンドロイチン硫酸濃度および複合体形成の膨潤におよぼす影響を検討した。前報においては、pH 調整は McIlvaine 緩衝液にて行なったが、本報においては HCl あるいは NaOH を用いた。

コンドロイチン硫酸 (C 型の Na 塩) およびゼラチンは前報と同じものを用いた。

実験結果

膨潤の pH 変化

ゼラチン、コンドロイチン硫酸混合膜 (以後混合膜で表わす) の膨潤を種々の pH (=2.9—7.0) にて測定した。pH は HCl あるいは NaOH にて調整し、測定温度は 37° とした。膨潤の実験結果を Fig. 1 に示す。用

1) 第1報: 米勢政勝, 中垣正幸, 薬誌, 95, 1 (1975).

2) Location: a) Tanabe-Dori, Mizuho-ku, Nagoya; b) Yoshida Shimoedachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto.

3) a) P.J. Flory, J. Rehner, *J. Chem. Phys.*, 11, 521 (1943); b) P.J. Flory, *Chem. Rev.*, 35, 51 (1944); c) J.R. Schaefgen, P.J. Flory, *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 689 (1950).

4) P.W. Kuhn, B. Hargitay, A. Katchalsky, H. Eisenberg, *Nature*, 165, 514 (1950).

5) H.R. Kruyt, "Colloid Science II," Elsevier Publishing Co. Inc., New York, 1949, p. 584.

Fig. 1. Effect of pH on the Swelling of Mixed Membrane

The membrane used; $X_{chs}=0.226$, $F=2.2$ mm/g swelling time (hours);

—○—: $t=102.3$ —□—: $t=73.3$ —△—: $t=49.5$
—◇—: $t=24.3$ —●—: $t=2.0$

$$\frac{d(m_{H_2O}/m_M)}{dt} = k \left(\frac{m_{H_2O}}{m_M} \right)$$

で表わせるとすると

$$\log \left(\frac{m_{H_2O}}{m_M} \right) = \left(\frac{k}{2.303} \right) t + \log \left(\frac{m_{H_2O}}{m_M} \right)_0 \quad (2)$$

の関係が得られる。ただし k は膨潤速度定数である。Fig. 2 に示されるようにゼラチンの等イオン pH(=4.9) よりアルカリ側での結果は、式 (2) を満足したが、酸性側の pH=2.9, 3.9 では $t=80$ 時間以上になると直線からはずれた。そこで膨潤時間 50 時間までの範囲で Fig. 2 の直線関係から膨潤速度定数 k および $\log(m_{H_2O}/m_M)_0$ を求め、これらの結果と pH の関係を Fig. 3 に ×印で示す。 k は pH=2.9 で負の値 (-0.0023) となり pH に伴い増加した。 $(m_{H_2O}/m_M)_0$ はほぼ 3.5 となった。

Fig. 2. The Relation between $\log(m_{H_2O}/m_M)$ and Swelling Time (t) at Various pH

The membrane used; $X_{chs}=0.226$, $F=2.2$ mm/g
pH of solution; 2.9(○), 3.9(□), 4.9(△), 6.0(×), 7.0(◇)

いた混合膜のコンドロイチン硫酸の含有率は重量分率 X_{chs} で表わすと 0.226 であり、膜の不溶化のため添加したホルムアルデヒド量 F はゼラチン 1 g 当り 2.2 mm/g であった。縦軸は膜中の水の含有率 W_{H_2O} 、横軸は pH を示し、結果は一定膨潤時間 t ごとに示されている。膜中のゼラチン、コンドロイチン硫酸および水の重量を m_{ge} , m_{chs} , m_{H_2O} で表わし、 $m_M = m_{ge} + m_{chs}$ とすると、 $X_{chs} = m_{chs} / (m_{chs} + m_{ge})$, $W_{H_2O} = m_{H_2O} / (m_M + m_{H_2O})$ である。

膨潤時間 $t=2$ 時間では W_{H_2O} の pH 変化は、用いたゼラチンの等イオン pH=4.9 で極小値となり、それからずれるに従いわずかであるが増加した。膨潤時間 t が長くなると、pH=4.9 以下では pH が小さくなるに従い W_{H_2O} は減少した。 $t=102.3$ では pH=3.9 で極小値となった。膨潤実験は膜のやわらかさのため測定不可能になるまで続けたが、混合膜の膨潤は各 pH 溶液中とも測定範囲内では平衡膨潤には達しなかった。Fig. 2 には $\log(m_{H_2O}/m_M)$ と膨潤時間 t との関係を示す。膨潤速度式が前報と同様

(1)

Fig. 3. Effect of pH on the Swelling Rate Constant, k , and $(m_{H_2O}/m_M)_0$ of the Mixed Membranes

The Membrane used; X_{chs} F (mm/g)
○ 0.0 1.0
● 0.108 1.0
□ 0.226 1.0
△ 0.317 1.0
× 0.226 2.2

コンドロイチン硫酸濃度の影響

コンドロイチン硫酸の重量分率 X_{chs} が 0.0, 0.108, 0.226, 0.317 の 4 種類の混合膜を用いた。添加ホルムアルデヒド量 F はコンドロイチン硫酸の影響をより見やすくするために、上に述べた膜より少なく、1.0 mm/g とした。これらの膜の膨潤を pH=5.6, 4.2, 2.9 で測定した。膨潤時間 t が 50 時間以上になると膜のやわらかさのため膨潤測定は不可能になったが、膨潤初期の $\log(m_{H_2O}/m_M)$ と t の直線関係より膨潤速度 k と $(m_{H_2O}/m_M)_0$ を求め、pH との関係を図 3 に併せ示した。 k と pH の関係をみると、 $X_{chs}=0$ のゼラチン膜の結果と混合膜の結果とで顕著に異なった。前者では、pH=5.6 の場合より pH=2.9 で k は少し大きくなった。しかしながら後者では pH が酸性になるに従い k は逆に減少し、pH=2.9 では負の値となった。しかも X_{chs} が大きいほど k は減少した。 $(m_{H_2O}/m_M)_0$ は pH に依存せず、 X_{chs} が増加するに従い大きくなった。

混合膜 ($X_{chs}=0.226$, $F=2.2$ mm/g) と混合膜 ($X_{chs}=0.226$, $F=1.0$) とを比較すると、ホルムアルデヒド量 F の増加、つまりゼラチン分子間の架橋点の増加によって $(m_{H_2O}/m_M)_0$ は減少し、 k の絶対値も小さくなった。

膜厚および膜半径の変化

混合膜 ($X_{chs}=0.226$, $F=2.2$ mm/g) の種々の pH 溶液中での膜厚比 L/L^0 、膜半径比 r/r^0 と膨潤時間 ($t-t^0$) の関係を Fig. 4 および 5 に示す。ただし基準値としての L^0 および r^0 は各試験溶液中で t^0 時間膨潤させた

Fig. 4. Relation between the Ratio of Membrane Thickness (L/L^0) and Swelling Time ($t-t^0$)

The membrane used; $X_{chs}=0.226$, $F=2.2$ mm/g
pH of solution; 2.9(●), 3.9(○), 4.9(□), 6.0(×), 7.0(△)

膜厚および膜半径である。 t^0 は約 2 時間とした。 L/L^0 は t とともに増加し、また pH がアルカリ側になるに従い増加した。しかしながら r/r^0 は pH=2.9, 3.9 では t とともに減少し、pH=4.9 以上では $t-t^0=50$ 時間まではほとんど変化しなかった。そこで前報¹⁾と同様に次式で定義される膜厚増加率 α_L 、膜半径増加率 α_r を求める。

$$L/L^0 = 1 + \alpha_L \cdot (t-t^0) \quad (3)$$

$$r/r^0 = 1 + \alpha_r \cdot (t-t^0) \quad (4)$$

ただし、直線関係が満足される $t-t^0=50$ 時間までの範囲内で α_L および α_r を求めた。Fig. 6 に求めた α_L および α_r と pH の関係を × 印で示す。pH が 5 以下の酸性になると、両者とも減少し α_L および α_r と pH の関係は同じ傾向を示すことがわかった。特に α_r は pH=

Fig. 5. Relation between the Ratio of Membrane Radius (r/r^0) and Swelling Time ($t-t^0$)

The membrane used; $X_{chs}=0.226$, $F=2.2$ mm/g
pH of solution; 2.9(●), 3.9(○), 4.9(□), 6.0(×), 7.0(△)

Fig. 6. Effect of pH on the Rate of Increase of Membrane Thickness, α_L , and that of Membrane Radius, α_r

The membrane used; X_{chs} F (mm/g)
○ 0.0 1.0
● 0.108 1.0
□ 0.226 1.0
△ 0.317 1.0
× 0.226 2.2

TABLE I. The Parameters for the Swelling of the Mixed Membranes in Various pH

X_{chs}	F (mm/g)	pH	k	$(W_{H_2O}/W_M)_0$	α_L	α_r	(α_r/α_L)
0.0	1.0	5.6	0.0097	4.1	0.018	-0.00040	-0.022
		4.2	0.0106	4.1	0.019	-0.00090	-0.047
		2.9	0.0184	4.1	0.025	0.0024	0.096
0.108	1.0	5.6	0.0289	5.5	0.019	0.0044	0.24
		4.2	0.0129	5.5	0.015	-0.0024	-0.17
		2.9	-0.00921	5.5	0.022	0.0016	0.073
0.226	1.0	5.6	0.0332	8.0	0.022	0.0096	0.44
		4.2	0.0166	8.0	0.018	0.0036	0.20
		2.9	-0.0221	8.0	0.0044	-0.011	-2.52
0.317	1.0	5.6	0.0340	14.0	0.024	0.012	0.50
		4.2	0.0184	12.0	0.020	0.0076	0.34
		2.9	-0.0253	11.0	-0.0095	-0.024	2.53

3.9, 4.9 では負の値 (収縮) となった。

コンドロイチン硫酸含有率の影響を検討するため膨潤速度を求めた時と同様, $X_{chs}=0.0-0.317$ の混合膜 ($F=1.0$ mm/g) を用いた. pH=2.9, 4.2, 5.6, での L/L^0 および r/r^0 と膨潤時間 ($t-t^0$) との関係から, 式 (3), (4) に従い α_L および α_r を求め Table I に示す. ただしこれらの値は, $t-t^0=30$ 時間までの範囲内での直線関係から求めた. これらの結果を Fig. 6 に示した. X_{chs} の等しい膜で α_L と α_r を比較すると, それらの pH 変化は同じ傾向をもって変化していることがわかる. つまり, $X_{chs}=0$ のゼラチン膜では α_L および α_r は pH が減少するに従い増加した. しかし $X_{chs}=0.317$ の混合膜では, それらの値はともに減少し pH=2.9 では両者とも負の値になった.

ホルムアルデヒド添加量の異なる 2 つの膜, 膜 ($X_{chs}=0.226, F=2.2$ mm/g) と膜 ($X_{chs}=0.226, F=1.0$ mm/g) の結果を比較すると, F の増加によって α_L および α_r の pH 変化は小さくなることがわかった.

異方性膨潤

前報と同様に α_r/α_L を膨潤の異方性の尺度と考える. $\alpha_r/\alpha_L=1.0$ の場合が等方性膨潤を示す. Fig. 7 に各膜の α_r/α_L と pH の関係を示す. 破線は $\alpha_r/\alpha_L=1.0$ を示している. pH=5.6, 4.2 では α_r/α_L はほぼ 0—0.4 の範囲の値であったが, pH=2.9 ではその値は X_{chs} によって大きく異った. $X_{chs}=0$ および 0.108 の膜では, α_r/α_L はほぼ零であり, $X_{chs}=0.226$ の膜では -2.52 と負の値となった. $X_{chs}=0.317$ の膜では 2.53 と正の値となり, これは膜厚 L も膜半径 r も減少し, しかも r の減少率が大きかったためである.

Fig. 7. Effect of pH on Asymmetrical Swelling

The membrane used;	X_{chs}	F (mm/g)
○	0.0	1.0
⊙	0.108	1.0
□	0.226	1.0
△	0.317	1.0

Fig. 8. The Relation between the Swelling Rate, k , and the Weight Fraction of Chondroitin Sulfate, X_{chs}

○	pH 5.6
×	pH 4.2
△	pH 2.9

考 察

膨潤速度の複合体形成による影響

Table I に示された膨潤速度 k の複合体形成による影響を検討する。 k と X_{chs} の関係は Fig. 8 に示されるように、pH=5.6, 4.2 では k は X_{chs} 増加とともに大きくなった。しかし pH=2.9 では k は減少し負の値となった。

いま膨潤速度定数 k を次式で表わす。

$$k = X_{ge} \cdot k_{ge} + X_{chs} \cdot k_{chs} + \Delta k_{comp} \quad (5)$$

ただし X_{ge} , X_{chs} はゼラチンおよびコンドロイチン硫酸の重量分率である。 $X_{ge} + X_{chs} = 1$ 。 k_{ge} はゼラチンのみからなる膜 ($X_{chs} = 0$) の膨潤速度定数、 k_{chs} はコンドロイチン硫酸のみからなる仮想的な膜の膨潤速度定数を表わす。また Δk_{comp} はゼラチンとコンドロイチン硫酸の複合体形成による膨潤速度への寄与を表わす項である。

混合膜は pH=5.6 において透明な褐色であるが、pH=4.2, 2.9 では不透明乳白色の膜に変化する。これは膜中での不溶性複合体形成によるものと考えられる。両高分子の混合溶液では、pH=5.6 で可溶性複合体が形成され、ゼラチンの等イオン pH (=4.9) より少し酸性の pH=4.5 近辺から不溶性複合体が形成されはじめる。⁶⁾ それゆえ pH=5.6 でも混合膜中において、複合体が形成されていると考えられる。しかしこの複合体は可溶性であるから膜膨潤への影響は無視できるとすると k は

$$k = X_{ge} \cdot k_{ge} + X_{chs} \cdot k_{chs} \quad (5')$$

で表わせる。pH=5.6 でのゼラチン膜の膨潤速度定数 k_{ge} と各混合膜の k から式 (5') によって k_{chs} を求めた。結果は Fig. 9 に示されるように、 k_{chs} は X_{chs} にかかわらずほぼ一定の値 ($k_{chs} = 0.098$) となった。

k_{ge} は pH によってあまり大きな変化を示さなかったもので、 k_{chs} も pH にほとんど依存せず pH=5.6 での値 0.098 とほぼ等しい値を有すると仮定し、各 pH でのゼラチン膜の膨潤速度定数 k_{ge} および各混合膜の k 値から、式 (5) より Δk_{comp} を求めた。これらの結果も Fig. 9 に示した。 Δk_{comp} は pH=4.2, 2.9 で負の値となり、 X_{chs} とともに減少した。また pH が小さいほど Δk_{comp} は小さな値となった。これより、pH が減少するに従い、また X_{chs} が増加するに従い ($X_{chs} = 0 - 0.317$ の範囲)、混合膜の膨潤速度は膜中での不溶性複合体形成によって抑制されるといえる。

異方性膨潤の複合体形成による影響

α_L および α_r と X_{chs} の関係は Fig. 10 に示されている。pH=5.6 では α_L , α_r はともに X_{chs} 増加とともに

Fig. 9. Effect of Complex Formation on the Swelling Rate

k_{comp} ; × (pH=4.2), △ (pH=2.9)
 k_{chs} are plotted with ○. Dashed line is the mean value of k_{chs} (0.098).

Fig. 10. Effect of pH on the Rate of Increase of Membrane Thickness, α_L and that of Membrane Radius, α_r at Various pH

pH of solution; 2.9(△), 4.2(×), 5.6(○)

- 6) 可溶性複合体形成は粘度測定より確かめ、不溶性複合体形成は遠心分離法により沈殿物を分離して確かめた (投稿準備中)。

大きくなり, pH=4.2 では $X_{chs}=0.108$ で極小値を有した. さらに pH=2.9 では X_{chs} 増加とともに α_L, α_r はともに減少した. そこで異方性膨潤の複合体形成による影響を検討するため, 式 (5) と同じ考え方で α_L および α_r を次式で表わす.

$$\alpha_L = X_{ge} \cdot (\alpha_L)_{ge} + X_{chs} \cdot (\alpha_L)_{chs} + (\Delta\alpha_L)_{comp} \quad (6)$$

$$\alpha_r = X_{ge} \cdot (\alpha_r)_{ge} + X_{chs} \cdot (\alpha_r)_{chs} + (\Delta\alpha_r)_{comp} \quad (7)$$

ただし, $(\alpha_L)_{ge}, (\alpha_r)_{ge}$ はゼラチンのみからなる膜 ($X_{chs}=0$) の膜厚増加率, 膜半径増加率であり, $(\alpha_L)_{chs}, (\alpha_r)_{chs}$ はコンドロイチン硫酸のみからなる仮想的な膜 ($X_{chs}=1$) の膜厚増加率, 膜半径増加率である. $(\Delta\alpha_L)_{comp}, (\Delta\alpha_r)_{comp}$ はゼラチンとコンドロイチン硫酸の複合体形成による膜厚増加率, 膜半径増加率への寄与を表わす項である. Δk_{comp} を求めた同時とじく, pH=5.6 では $(\Delta\alpha_L)_{comp}$ および $(\Delta\alpha_r)_{comp}$ は無視できるとすると式 (6), (7) は

$$\alpha_L = X_{ge} \cdot (\alpha_L)_{ge} + X_{chs} \cdot (\alpha_L)_{chs} \quad (6')$$

$$\alpha_r = X_{ge} \cdot (\alpha_r)_{ge} + X_{chs} \cdot (\alpha_r)_{chs} \quad (7')$$

で表わせる. pH=5.6 でのゼラチン膜の膜厚増加率 $(\alpha_L)_{ge}$, 膜半径増加率 $(\alpha_r)_{ge}$ を用い, pH=5.6 での各混合膜の結果 α_L と α_r から式 (6'), (7') によって $(\alpha_L)_{chs}$ および $(\alpha_r)_{chs}$ を求めた. Fig. 11 にその結果を示す. これらの値は X_{chs} にかかわらず, ほぼ一定の値となり, しかも $(\alpha_L)_{chs}$ と $(\alpha_r)_{chs}$ は後者が少し大きいがほぼ等しい値となった. 一方 pH=5.6 でのゼラチン膜の結果 $(\alpha_L)_{ge}, (\alpha_r)_{ge}$ は Table I に示されるように前者の方が後者より大きかった.

pH=4.2, 2.9 における $(\alpha_L)_{chs}, (\alpha_r)_{chs}$ も上で求めた値と等しいと仮定する. そして各 pH でのゼラチン膜の $(\alpha_L)_{ge}, (\alpha_r)_{ge}$ を用い, pH=4.2, 2.9 での各混合膜の結果 α_L, α_r から式 (6), (7) によって $(\Delta\alpha_L)_{comp}$ および $(\Delta\alpha_r)_{comp}$ を求めた. Fig. 11 にその結果を示す. $(\Delta\alpha_L)_{comp}$ も $(\Delta\alpha_r)_{comp}$ もともに負の値となった. そしてこれらの値は各 pH ではほぼ等しく, pH=2.9 では X_{chs} 増加とともに減少した.

Fig. 11. Effect of Complex Formation on the Rate of Increase of Membrane Thickness and that of Membrane Radius

$(\alpha_L)_{chs}$ and $(\alpha_r)_{chs}$ are plotted with ■ and ○, respectively.
 $(\Delta\alpha_L)_{comp}$ and $(\Delta\alpha_r)_{comp}$ are plotted with following marks.

	pH 4.2	pH 2.9
$(\Delta\alpha_L)_{comp}$	x	Δ
$(\Delta\alpha_r)_{comp}$	⊗	▲

結 論

Fig. 9 に示されているように, Δk_{comp} は pH が酸性になるほど負に大きくなった. つまり, pH が酸性ほど複合体形成の影響は大きくなり, 混合膜の膨潤速度を減少させることがわかった. 膜膨潤の異方性をみると, 膜半径増加率 α_r は膜厚増加率 α_L より小さい異方性の膨潤を示す. しかし $(\alpha_L)_{comp}$ および $(\alpha_r)_{comp}$ は各 pH において等しく, ともに負の値であった. つまり不溶性複合体形成は膜半径方向, 膜厚方向に同等に収縮作用することがわかった. したがって混合膜の異方性膨潤の原因は, 前報において報告したように膜内におけるゼラチン分子の配列の異方性に原因することが結論される.

混合膜は Fig. 1 に示されるように, 低い pH 領域で膨潤しにくい膜であり, 薬学的には腸溶性のカプセル膜などに好都合な膜であることがわかった.

実 験 の 部

実験試料 ゼラチンおよびコンドロイチン硫酸; 前報¹⁾ と同じものを用いた.

試薬; 全て試薬特級を用いた.

水; 蒸留後イオン交換し, 比抵抗 $5 \times 10^6 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 以上のイオン交換水を用いた.

混合膜の作り方 コンドロイチン硫酸の重量分率 $X_{chs}=0, 0.108, 0.226, 0.317$ の混合溶液を $45-50^{\circ}$ で調整する。不溶化のため添加されたホルムアルデヒド量 F はゼラチン 1 g 当り 1.0 mm/g あるいは 2.2 mm/g であった。膜の作り方は前報と同じである。

膜膨潤の測定 膜を $\text{pH}=2.9-7.0$ の溶液中に入れ、 37° の恒温器中で一定時間静置する。pH は HCl あるいは NaOH にて調整した。そして一定時間ごとに膜の重量、膜の厚さ、膜半径を測定した。膜の厚さは前報で述べた顕微鏡法を用いた。

謝辞 本研究に用いたゼラチンを分与された新田ゼラチン株式会社およびコンドロイチン硫酸を分与された科研薬化工株式会社に感謝する。