Study of Mechanical Properties of Poly (Vinyl Alcohol) and Collagen Hydrogels Using a Response Surface Methodology

Jian-yu Wang [1,2], Hai Lin[1,2], Lin-li Sun[1], Wei-hua Dan[1,2], Nian-hua Dan[1,2], Yang Hu [1,2], Sheng Tang [3]

1. Department of Biomass Chemistry and Engineering, Sichuan University, Chengdu, 610065, P.R. China;

2. The Research Center of Biomedical Engineering, Sichuan University, Chengdu, 610065, P.R. China.

3. Jiangyin Benshine Biotechnology Co., Ltd., jiangyin, 214432, P.R. China

Email: dwh5607@263.net, wangjianyu001@163.com

Abstract: The poly (vinyl alcohol) was modified to introduce the carboxyl groups which can be utilized to covalent bond with collagen through the cross linke, that is 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride and N-Hydroxysuccinimide. The hydrogels were prepared with different techniques, such as the ratio of modified PVA to collagen, the cross-linker and the times of freezing and thawing. Using a response surface methodology, the mechanical properties of the hydrogels (tensile strength and elongation at break) were analyzed. The results indicated that the response surface models could significantly fit the response values. Moreover, the results shown that the interactions between factors had more obvious effects to the physical properties of PVA-COL hydrogels than the single one. After the analysis of factors' influences and deduced from the data and trends, the driving force behind these might be the re-orientation or re-crystallization structure of the hydrogels.

Keywords: poly (vinyl alcohol); collagen; hydrogels; physical properties; RSM

响应曲面分析法对聚乙烯醇-胶原水凝胶机械性能的研究

王建宇 [1, 2]，林海 [1, 2]，孙林丽 [1]，但卫华 [1, 2]，但年华 [1, 2]，胡杨 [1, 2]，汤圣 [3]

1. 四川大学，生物质化学与工程系，四川 成都，610065；
2. 四川大学，生物医学工程研究中心，四川 成都，610065
3. 江阴奔翔生物科技股份有限责任公司，江苏 江阴，214432

Email: dwh5607@263.net, wangjianyu001@163.com

摘　要：将聚乙烯醇改性引入羧基，在 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐（EDC）和 N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）的作用下使其与胶原共价交联。采用不同工艺条件制备水凝胶，如改性 PVA 与胶原的质量比，交联剂的用量以及冻融次数等。运用 Design Expert 软件，采用响应曲面法分析水凝胶的机械性能（拉伸强度和断裂伸长率），并建立数学模型。结果表明，响应面模型能对响应值进行拟合且拟合程度较高。此外，实验结果还表明因素之间的相互作用比单因素对聚乙烯醇-胶原水凝胶的机械性能有更明显的影响。通过对变化趋势的分析，认为影响它们的主要原因可能是水凝胶重定位或重结晶后的结构。

关键词：聚乙烯醇；胶原蛋白；水凝胶；机械性能；响应曲面法

1 引 言

聚乙烯醇是一种合成高分子聚合物，因其优异的性能而被广泛的研究并且在许多行业[1]中得到应用，包括食品，生物医学[2,3]，环境工程等。在生物医学工程领域，基于聚乙烯醇的产品可作为人工关节，药物

978-1-935068-41-9 © 2010 SciRes.

载体或创面覆盖材料等。胶原是一种天然高分子聚合物，具有独特的生物学性能[4]。因此，将聚乙烯醇与胶原共混或直接交联，能够获得各方面性能更好的产品，其中产品包括将二元共混制膜，水凝胶[5,6]，海绵[7]和微球等。

由于聚乙烯醇的羟基不具有高反应性，聚乙烯醇与胶原之间的反应既不可控也不能共价结合。大多数的研究报道只是将两者共混[8]或者紫外线照射[9]。A. Sionkowska 证明了聚乙烯醇与胶原之间是部分混溶[10]，而且胶原会降低 PVA 的稳定性。但是很少有报道将聚乙烯醇引入羧基来提高聚乙烯醇与胶原间交联程度的研究。聚乙烯醇中的部分羟基被羧基取代后，可以用羧基活化剂和交联剂（如碳化二亚胺等）将它与胶原的羧基和氨基进行交联改性。

本研究拟运用 Design Expert 软件，用响应曲面法及数学模型研究不同的制备工艺对聚乙烯醇-胶原水凝胶（PCH）机械性能的影响。制备工艺条件包括改性 PVA 与胶原的质量比（cPVA/COL）、交联剂 EDC 和 NHS 的摩尔浓度（EDC/NHS）以及冻融次数（TFT）等。评价水凝胶机械性能的标准有拉伸强度（TS）和断裂伸长率(E@B)。

2 材料与方法

2.1 材料

聚乙烯醇，分析纯，科龙化工（成都，四川），平均聚合度为 1700 ± 50，醇解度为 99%。胶原，自制[11]。

EDC和NHS均购于上海共价化学科技有限公司（上海），其纯度均大于 99%。

其它化学试剂均为市购分析纯，使用前未进行纯化。

2.2 聚乙烯醇的改性

准确称取聚乙烯醇 m_0 mol 加到蒸馏水中浸泡，置于室温下溶胀 12 小时。称取 m_1 mol 氯乙酸放入三颈瓶中，用 3mol/L 的氢氧化钠溶液冰浴条件下溶解，调节 pH 值约为 7.00。控制 m_1 与 m_0 的物质的量之比是 1.5:1。然后将三颈瓶置于水浴中加热，缓慢升至 65℃。慢慢加入溶胀后的聚乙烯醇，搅拌使其充分分散在溶液中。将 1/3m_1 mol 碳酸钠加到三颈瓶中，作为缓冲剂。用氢氧化钠溶液将 pH 值调到 12。将此溶液置于 75℃下，水浴加热；并使 pH 值保持在 12 左右，反应 5 个小时。在此条件下，部分 PVA 的羟基会和氯乙酸中的氯元素发生反应，从而向 PVA 中引入了羧基。反应结束后，将溶液冷却，过滤。把所得产物用 0.1 mol / L 的盐酸充分清洗，然后再用大量蒸馏水冲洗。最后，将得到的产物于 45℃的真空干燥箱中干燥（将干燥后的产物标记为 cPVA）。

2.3 聚乙烯醇-胶原水凝胶的制备

2.3.1 cPVA 水分含量的测定

将称量瓶恒重，加入 cPVA，准确称重。将称量瓶放入烘箱内，105℃干燥，当样品达到恒重时计算 cPVA 的水分含量。

2.3.2 cPVA 羧基含量的测定

按照国家标准（即 GB 12010.5-1989）测定 cPVA 中羧基含量。采用的方法是标准氢氧化钠溶液和标准硫酸溶液滴定法。

2.3.3 cPVA 溶液的制备

根据干重，将一定质量的 cPVA 溶于蒸馏水中配成浓度为 8%的 cPVA 溶液。将 cPVA 在 50℃下溶胀 2 小时，并使其在 90℃下搅拌溶解，冷却，得到 cPVA 溶液。

2.3.4 胶原溶液的制备

准确称取一定质量的胶原海绵，使其在 4℃条件下溶于 0.2 mol/L 的醋酸中，得到浓度为 0.5%的胶原溶液。

2.3.5 聚乙烯醇-胶原水凝胶的制备

按照表 1 所示的实验设计和表 2 所示的实验详细方案，将 40g 的 cPVA 溶液加入到锥形瓶中，按照表 2 中制定的浓度先后加入 NHS 和 EDC（体积为 40ml），分别搅拌 10 分钟。将所需胶原溶液加入锥形瓶，25℃下，搅拌 4 小时。待充分反应后，取 20g 溶液倒入表面皿 (Φ=10 cm) 中，立即在-20℃下冷冻。冷冻 7-12h 后，将水凝胶置于室温下，在通风处解冻 1h，冻融次数按照表 2 所示。反复冻融后将水凝胶在蒸馏水中浸泡 3 天，并且经常换水。将制得的水凝胶用密封袋密封后低温冷藏。

Table 1.Factors and levels of RSM test design
表 1. 三因素水平响应曲面分析实验设计

因素	实际低值	实际高值	编码低值	编码高值
cPVA/Col$_a$	20	50	-1	1
EDC/NHS	30	70	-1	1

[b]				
TFT [c]	3	11	-1	1

标注：[a]：cPVA/COL = cPVA 与胶原的质量比；[b]：EDC/NHS = EDC 和 NHS 的摩尔浓度（mmol/L）；[c]：TFT=反复冻融的次数

2.3.6 实验方法

用响应曲面法（RSM）来研究 cPVA 与胶原的质量比（cPVA/COL）、EDC 和 NHS 的摩尔浓度（EDC/NHS）以及冻融次数（TFT）等因素对水凝胶机械性能的影响。实验因素和水平设计见表 1，三因素实验设计方案是由 Design Expert（7.1 版本试用）生成的（见表 2）。

2.4.1 拉伸强度

用哑铃形模具对水凝胶取样，样品长度为 20mm、宽度为 5mm。用定重式测厚仪（GT-313A1，中国台湾高铁科技股份有限公司，台湾）测定样品的厚度。用电子拉力机（AI-7000S，中国台湾高铁科技股份有限公司，台湾）测定的样品拉伸强度，夹钳的移动速度为 100mm/min。

2.4.2 断裂伸长率

同样方法，用哑铃形模具对水凝胶取样，样品长度为 20mm、宽度为 5mm。用定重式测厚仪测定样品的厚度。用电子拉力机测定的样品的断裂伸长率，夹钳的移动速度为 100mm/min。

2.4 聚乙烯醇-胶原水凝胶的机械性能检测

Tab. 2 The design for characterization and the response values of PCH

表 2 聚乙烯醇-胶原水凝胶实验方案及检测结果

标准号	操作号	cPVA/Col	EDC/NHS	TFT	拉伸强度 (TS, MPa)	断裂伸长率 (E@B, %)
10	1	35 (0)	70 (1)	3 (−1)	0.280 ± 0.084	144.790 ± 22.436
3	2	20 (−1)	70 (1)	7 (0)	0.387 ± 0.123	155.672 ± 19.227
1	3	20 (−1)	30 (−1)	7 (0)	0.273 ± 0.026	137.346 ± 8.271
14	4	35 (0)	50 (0)	7 (0)	0.407 ± 0.087	138.844 ± 19.405
11	5	35 (0)	30 (−1)	11 (1)	0.288 ± 0.028	138.308 ± 21.366
7	6	20 (−1)	50 (0)	11 (1)	0.296 ± 0.056	169.136 ± 18.490
15	7	35 (0)	50 (0)	7 (0)	0.369 ± 0.028	143.257 ± 11.201
13	8	35 (0)	50 (0)	7 (0)	0.354 ± 0.020	155.929 ± 18.119
8	9	50 (1)	50 (0)	11 (1)	0.412 ± 0.054	174.525 ± 21.700
6	10	50 (1)	50 (0)	3 (−1)	0.283 ± 0.042	203.704 ± 17.100
9	11	35 (0)	30 (−1)	3 (−1)	0.303 ± 0.148	166.053 ± 18.229
4	12	50 (1)	70 (1)	7 (0)	0.364 ± 0.082	162.658 ± 4.304
12	13	35 (0)	70 (1)	11 (1)	0.510 ± 0.114	183.501 ± 9.198
5	14	20 (−1)	50 (0)	3 (−1)	0.383 ± 0.031	185.535 ± 6.625
2	15	50 (1)	30 (−1)	7 (0)	0.411 ± 0.032	159.554 ± 8.281

表 3 响应值变化时回归模型方差分析

Tab. 3 The ANOVA analysis results of variance for response

响应因素	来源	平方和	自由度	平方根	F 值	P 值	R2
拉伸强度	标准	0.053	6	0.008777	6.38	0.0100	0.8271
	误差	0.011	8	0.001376			
	失拟项	0.009476	6	0.001579	2.06	0.3621	
	随机误差	0.001532	2	0.0007659			

978-1-935068-41-9 © 2010 SciRes.

	总计	0.064	14				
断裂伸长率	标准	4845.68	9	538.41	4.79	0.0496	0.8961
	误差	561.72	5	112.34			
	失拟项	404.42	3	134.81	1.71	0.3891	
	随机误差	157.03	2	78.65			
	随机误差	39.82	2	19.91			
	总计	295.06	14				

3 结果和讨论

3.1 cPVA 的性能表征

3.1.1cPVA 的含水量

随机取三份 cPVA 样品，干燥后得出其含水量为 32.41％± 1.43％。

3.1.2 cPVA 的羧基含量

从样品袋中随机称取测试样本，精确称量。根据标准测得 cPVA 的羧基含量为 0.957± 0.024 mmol /g

3.2 聚乙烯醇-胶原水凝胶（PCH）的性能表征

本实验制备的 PCH 均为无色，均质，有弹性，易于操作。响应曲面法的试验设计结果见表 2。

3.2.1 PCH 的拉伸强度

在系统默认的五个模型中，双因素模型(2FI)比较适合用于本实验的数据分析。根据响应值的变化，方差分析结果见表 3，运用软件对试验结果进行多元回归拟合，得到关于拉伸强度的多项回归模型用拟合方程(1)来描述。

a:TS=0.43268+0.00147194A+0.000974527B-0.062054C -0.000134109AB+0.000905752AB+ 0.000767998BC

b:TS=0.35+0.017A+0.033B-0.032C-0.040AB+0.054BC +0.061AC （1）

注：A=PVA/COL；B=EDC/NHS；C=TFT; a 为实际值；b 为编码值

图 1 是水凝胶拉伸强度的残差分布情况与拟合值，从中可以看出，其残差各点几乎分布在一条直线上，模型拟合效果较好。根据表 3 响应值的方差分析结果得到方差 R^2=0.8271 说明显著性水平较高，具有统计学意义，F=6.38， P=0.01< 0.1 说明无差异性。失拟项 F=2.06，P=0.3621>0.1，具有随机性。由此说明此模型与数据的拟合程度很高，模拟方程 1 能在很大程度上解释响应值(拉伸强度)的变化，可以用此模型分析和预测出不同工艺参数制备的 PCH 的拉伸强度响应值结果。

由方程 1 得知，因素间的相互作用比单因素对 PCH 的拉伸强度有更明显的影响。据报道增加冻融次数可以提高水凝胶的拉伸强度[1,12]，

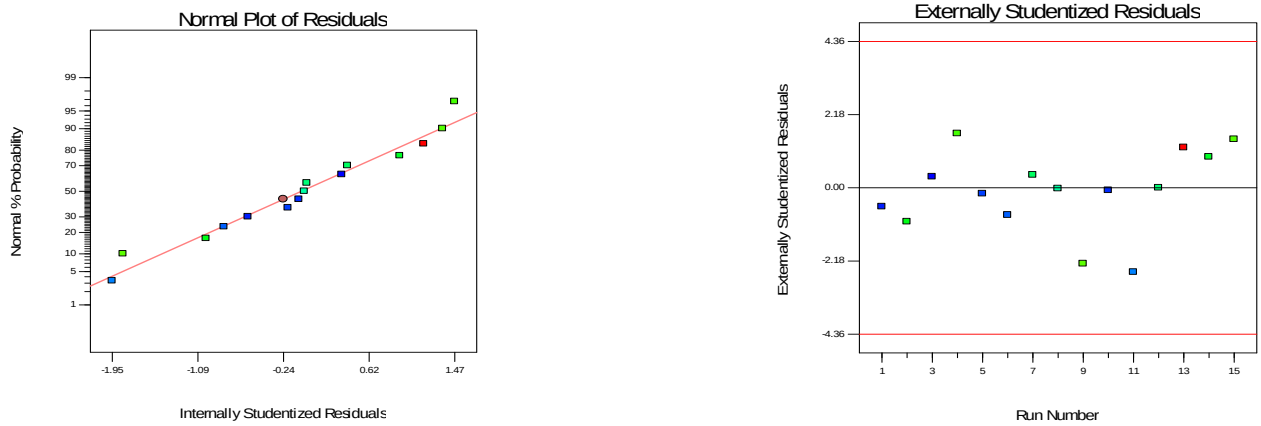

图 1 水凝胶拉伸强度残差图

Fig. 1 Residual plot for hydrogels' tensile strength (TS)

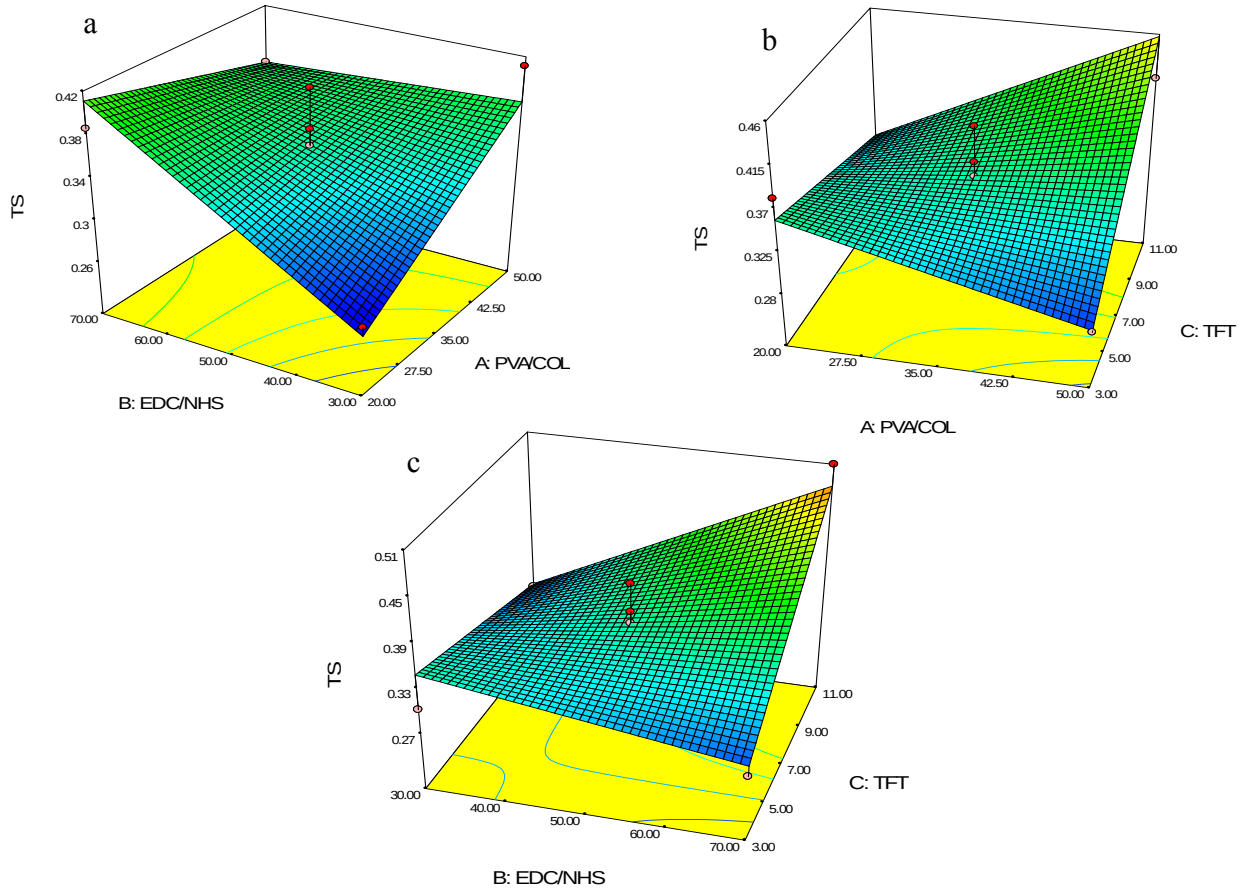

图 2.水凝胶拉伸强度（TS）的响应面：a. PVA/COL 与 EDC/NHS 的影响；b. PVA/COL 与 TFT 的影响；c.EDC/NHS 与 TFT.的影响

Fig. 2 The response surfaces for hydrogels' tensile strength (TS): a. effect of PVA/COL and EDC/NHS; b. effect of PVA/COL and TFT; c. effect of EDC/NHS and TFT.

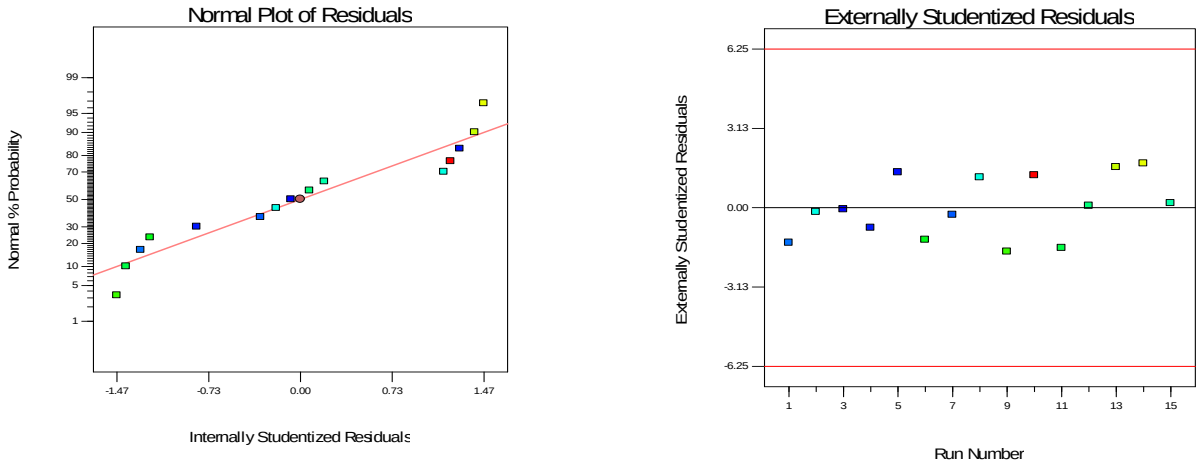

Fig. 3 Residual plot for hydrogels' elongation at break (E@B)

图 3 水凝胶断裂伸长率残差图

978-1-935068-41-9 © 2010 SciRes.

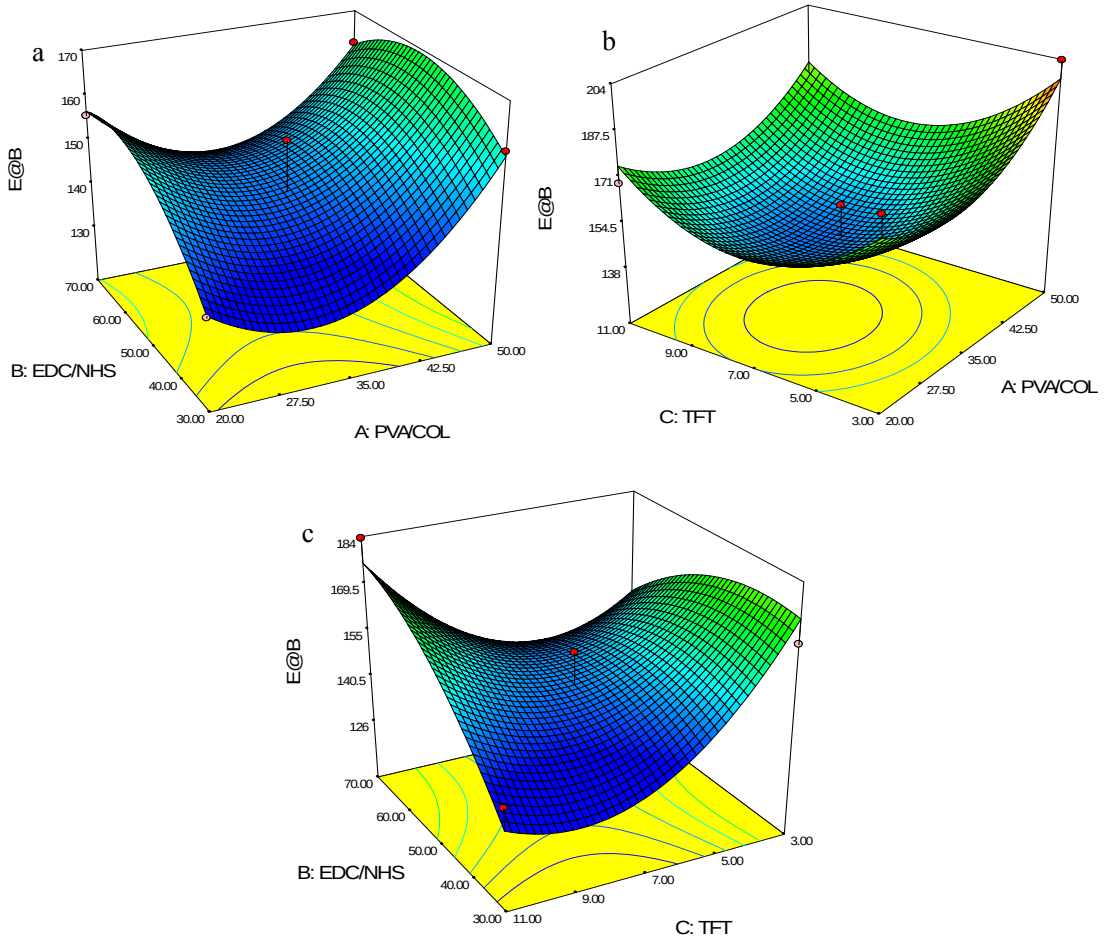

Fig. 4 The response surfaces for hydrogels' elongation at break (E@B): a. effect of PVA/COL and EDC/NHS; b. effect of PVA/COL and TFT; c. effect of EDC/NHS and TFT.

图 4 聚乙烯醇-胶原水凝胶断裂伸长率的响应曲面图

注：a PVA/COL 与 EDC/NHS 的相互作用；b PVA/COL 与 TFT 的相互作用；c：EDC/NHS 与 TFT 的相互作用

本实验也得到相同的结论，尤其是有交联剂参与的情况下。本实验进一步证实，制备水凝胶时 TFT 和 EDC/NHS 的影响比 cPVA 含量的影响更显著。从图 2.a 可以看出当 PVA / COL 比较低时（<35.00），拉伸强度随交联剂用量的增加而迅速降低。这可能是由于交联剂在 cPVA 的含量较低时，cPVA 与胶原以及胶原自身间的交联作用比 cPVA 含量较高时的作用更强。从图 2.c 可以看出，当 TFT 较高时图中曲线的斜率较大，而 TFT 小于 7 时曲线斜率较小。产生这种结果可能是因为在冻融过程中聚乙烯醇和胶原等大分子长链被重新定位甚至重结晶。这说明不仅材料的组份会影响水凝胶的机械性能，而且材料的结构对水凝胶的机械性能也会产生很大影响。

3.2.2 PCH 的断裂伸长率

二次模型比较适合断裂伸长率响应模拟的数据分析，数据的方差分析结果见表 3，同样，运用软件对试验数据进行多元回归拟合，得到的关于断裂伸长率的二次多项回归模型可以用拟合方程(2)来描述。

a：$E@B=260.61574 - 3.66490A + 1.43183B - 27.78872C - 0.012685AB - 0.053248AC + 0.20768\ BC + 0.073021A^2 - 0.021581B^2 + 1.29907C^2$

b：$E@B = 146.01 + 6.59A + 5.67B - 4.33C - 3.81AB - 3.19AC + 16.61BC + 16.43A^2 - 8.63B^2 + 20.79C^2$

（2）

注：A=PVA/COL；B=EDC/NHS；C= TFT；a 为实际值；b 为编码值

图 3 是水凝胶断裂伸长率的残差分布情况与拟合

值，从中可以看出，其残差各点几乎均匀分布在直线的两侧，说明模型拟合效果较好。根据表 3 响应值的方差分析结果得到方差 R^2=0.8961，说明显著性水平较高，F=4.79， P=0.0496< 0.1 说明无差异性，具有统计学意义。失拟项 F=1.714，P=0.3891>0.1，具有随机性。由此说明此模型与数据的拟合程度很高，模拟方程 2 能在很大程度上解释响应值(断裂伸长率)的变化，可以用此模型分析和预测出不同工艺参数制备的 PCH 的拉伸强度响应值结果。

图 4.a 显示的是一个马鞍型的响应曲面，说明随着交联剂 EDC/NHS 用量的增加，断裂伸长率出现一个峰值；图 4.b 显示的是一个凹形的响应面，说明存在极小值。该曲面也说明冻融次数（TFT）和 PVA / COL 对水凝胶的断裂伸长率也有类似的影响。而这些特征与图 2 中描述的趋势有所不同。根据物理学的基本原理可知，在某些情况下，材料经过高程度的重定位或重结晶使得拉伸强度会增加，但其断裂伸长率会降低。在 PCH 中，分子间交联程度越高，分子链表现的也越稳定。因此，交联剂 EDC/NHS 的用量越多，冻融次数越多，交联程度越高，分子间的交联结构也越多，而这些交联结构会增强 PCH 的机械性能。但是随着交联程度的增加断裂伸长率会达到一个极大值。于此，本实验的数据和响应曲面图完全符合这个理论。由图 4.c 中可以看出当 TFT 小于 7 时，随着交联剂 EDC/NHS 用量的不断增加，断裂伸长率随之增大；当 TFT 大于 7 时，随交联剂 EDC/NHS 的增加，断裂伸长率不断减小。这是因为 EDC/NHS 用量的不断增加会增大聚乙烯醇与胶原分子之间的交联程度，从而增大结晶度，使断裂伸长率逐渐增大。但当结晶度增大到一定程度时，断裂伸长率会达到一个极大值。这是由于过量的交联剂会使胶原中的活性基团完全反应，从而使长链大分子的刚性增加，从而在一定程度上失去定向能力，最终出现断裂伸长率略微降低的结果。

4 结 论

在一般情况下，cPVA 可以通过 EDC/NHS 交联系统与胶原反应。胶原能赋予聚乙烯醇-胶原水凝胶优良的生物学特性。在本研究中，我们用合理的数学模型研究了不同聚乙烯醇-胶原水凝胶的制备的工艺条件下水凝胶的机械性质。

虽然有些数据不明显，但可以反映出整体状态和一定的变化趋势。比较在影响聚乙烯醇-胶原水凝胶机械性能的因素中，因素之间的相互作用影响远远高于单一因素作用的影响。在响应曲面中影响最重要是 TFT^2，PVA/COL^2 和 PVA/COL×EDC/NHS 三大因素。

根据响应曲面分析得出影响水凝胶物理性能的最重要因素。结构的重定位或重结晶的程度可能是影响其机械性能的驱动力。如果能更好的控制水凝胶结构，就能赋予其更好物理性能。它的结构和控制方法将在以后的研究中作进一步研究。

References（参考文献）

[1] T.T. Brian Bolto, Manh Hoang, Zongli Xie, Crosslinked poly(vinyl alcohol) membranes, Progress in Polymer Science 34 (2009) 969-981.

[2] Y. Liu, N.E. Vrana, P.A. Cahill, G.B. McGuinness, Physically crosslinked composite hydrogels of PVA with natural macromolecules: Structure, mechanical properties, and endothelial cell compatibility, Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials 90(2) (2009) 492-502.

[3] A. Gupta, R. Kumar, N.K. Upadhyay, P. Surekha, P.K. Roy, Synthesis, characterization and efficacy of chemically crosslinked PVA hydrogels for dermal wound healing in experimental animals, Journal of Applied Polymer Science 111(3) (2009) 1400-1408.

[4] D.I. Zeugolis, R.G. Paul, G. Attenburrow, Engineering extruded collagen fibers for biomedical applications, Journal of Applied Polymer Science 108(5) (2008) 2886-2894.

[5] N.E. Vrana, L. Yurong, G.B. McGuinness, P.A. Cahill, Characterization of poly(vinyl alcohol)/Chitosan hydrogels as vascular tissue engineering scaffolds, Macromolecular Symposia 269(1) (2008) 106-110.

[6] E.E. Donaldson, J.L. Cuy, K.D. Hauch, A. Karchin, B.D. Ratner, Novel tissue scaffold materials based on poly(vinyl alcohol) and amino acid hydrogels, Biomaterials 2004 Congress Managers, Sydney, Australia, 2004. p. 102.

[7] S. Moscato, L. Mattii, D. D'Alessandro, M.G. Cascone, L. Lazzeri, L.P. Serino, A. Dolfi, N. Bernardini, Interaction of human gingival fibroblasts with PVA/gelatine sponges, Micron 39(5) (2008) 569-579.

[8] T.M.C.M. R.A. Carvalho, I.C.F. Moraes, Study of some physical properties of biodegradable fims based on blends of gelatin and poly(vinly alcohol) using a response-surface methodology, Materials Science and Engineering C 29 (2009) 485-491.

[9] A. Sionkowska, A. Panecka, J. Kozowska, J. Skopinska-Wisniewska, Surface properties of UV-irradiated poly(vinyl alcohol) films containing small amount of collagen, Applied Surface Science 255(7) (2009) 4135-4139.

[10] A. Sionkowska, J. Skopinska-Wisniewska, M. Wisniewski, Collagen-synthetic polymer interactions in solution and in thin films, Journal of Molecular Liquids 145(3) (2009) 135-138.

[11] D.W. Dan, H. Lin, R. Zeng. et al, The Optimization of Techniques and Modeling of the Process of Collagen Extraction from Pigskin with Pepsin, China Leather 35(5) (2006) 19-24, 26.
但卫华，林海，曾睿，等. 胃蛋白酶提取猪皮胶原蛋白的工艺优化与过程模拟[J]. 中国皮革，2006，35(5)： 19-24，26.

[12] S. Bhattacharyya, J.-P. Salvetat, M.-L. Saboungi, Reinforcement of semicrystalline polymers with collagen-modified single walled carbon nanotubes, Applied Physics Letters 88(23) (2006).

978-1-935068-41-9 © 2010 SciRes.