

文章编号:0253-4339(2013)04-0018-06
doi:10.3969/j.issn.0253-4339.2013.04.018

羟基磷灰石纳米微粒对不同种类低温保护剂 反玻璃化结晶的影响

吕福扣 刘宝林 李维杰

(上海理工大学生物热科学研究所 上海 200093)

摘 要 为了研究羟基磷灰石(HA)纳米微粒对不同种类低温保护剂(质量浓度为 60% 的渗透性丙三醇和质量浓度为 50% 的非渗透性 PEG-600)反玻璃化结晶的影响,利用低温显微镜研究了含有不同粒径(20nm、40nm、60nm)和不同质量浓度(0.1%、0.5%)HA 纳米微粒的丙三醇和 PEG-600 溶液在反玻璃化过程中的结晶现象。实验结果表明:丙三醇和 PEG-600 溶液在反玻璃化过程中的冰晶形貌分别为枝状和球形,且形貌都不随添加纳米微粒而改变。与未添加纳米微粒的丙三醇溶液相比,添加 60nm、0.5% 纳米微粒溶液的析晶分数仅为未添加溶液的 1/7。PEG-600 溶液在 $-64^{\circ}\text{C} \sim -52^{\circ}\text{C}$ 区间内的析晶分数显著增加,其中添加 40nm、0.5% 纳米微粒的 PEG-600 溶液的析晶分数增加了 90%。冰晶的生长速率存在两个极大值现象,而添加 40nm、0.5% 纳米微粒的丙三醇溶液、未添加和添加 60nm 纳米微粒的 PEG-600 溶液的冰晶生长速率都只有一个极大值。

关键词 低温显微镜;反玻璃化;冰晶形貌;冰晶分数;冰晶生长速率

中图分类号:TB383;TQ171.1

文献标识码:A

Effects of Hydroxyapatite Nanoparticles on Devitrification Crystallization of Different Kinds of Cryoprotectants

Lü Fukou Liu Baolin Li Weijie

(Institute of Biothermal and Technology, University of Shanghai for Science and technology, Shanghai, 200093, China)

Abstract To study the effects of Hydroxyapatite (HA) nanoparticles on devitrification of different cryoprotectant solutions, the crystallization of Glycerol (mass concentration is 60%) and PEG-600 (mass concentration is 50%) solutions with HA nanoparticles of different particle size (20nm, 40nm, 60nm) and concentrations (0.1%, 0.5%) were observed under a cryomicroscope. Experimental results showed that the morphology of Glycerol and PEG-600 solutions is dendritic and spheric respectively, and both structures are not changed by adding nanoparticles. The ice fraction of Glycerol solution containing 0.5% HA with the particle size of 60nm is 1/7 of that of Glycerol solution without nanoparticles. The ice fraction of PEG-600 solution increased drastically between -64°C and -52°C , and the ice fraction of PEG-600 solution containing 0.5% HA with the particle size of 40nm increased by 90%. Ice growth rate has two maximum normally, however, there is only one maximum in Glycerol solution containing 0.5% HA with the particle size of 40nm, PEG-600 solution with the particle size of 60nm, and PEG-600 solution without nanoparticles.

Keywords cryomicroscope; devitrification; morphology; ice fraction; ice growth rate

80 年代发展起来并日益受到广泛重视的生物材料玻璃化低温保存,是使细胞及其保护剂溶液以足够的降温速率,过冷到所谓玻璃化转变温度,而被固化成完全的玻璃态(或非晶态),并以这种玻璃态在低温下长期保存^[1-2]。通过快速冷却的方法,使纯水或含水稀溶液实现玻璃化,其所需的冷却速率数量约

为 $10^6 \sim 10^7^{\circ}\text{C}/\text{s}$,而且由于热容量的原因,能够实现玻璃化的样品体积很小。影响降温速率的主要因素是外界的冷量不能及时地传递到样品的内部,纳米微粒为减少样品的热阻,提高降温速率提供了一种有效途径。目前已有大量文献报道常温下纳米微粒能够有效地提高液体的导热系数^[3-5]。Hao 等^[6]和徐海峰

基金项目:国家自然科学基金(51076108)和教育部新世纪优秀人才计划(07-0559)资助项目。(The project was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 51076108) and the New Century Excellent Talent of Ministry of Education (No. 07-0559).)

收稿日期:2012 年 9 月 19 日

等^[7]将 HA 纳米微粒添加到聚乙烯吡咯烷酮(PVP)中,并用实验证实了添加纳米微粒提高低温下溶液的导热系数。

各种低温保护剂溶液在不同的冷却速率和初始浓度下,最终可能得到两种不同的玻璃化结果:完全的玻璃态,或者是部分结晶的玻璃态(PCG)。如果形成的固体中,晶体的体积百分数小于 10^{-6} ,即可认为实现了玻璃化转变。伴随着溶液中冰晶的形成和生长,会产生尖锐冰晶的机械损伤,高浓度毒性和渗透压损伤等,因此,研究溶液中冰晶的生长属性对玻璃化保存具有很好的指导作用。国内外众多学者利用低温显微镜研究了溶液冻结过程中冰晶的生长属性。利用低温显微镜研究生物材料的低温保存及冰晶的生长速率首先是由 Diller 和 Cravalho^[8]完成。Steponkuse 等^[9]搭建了等温型低温显微镜并用来研究冻结时的低温损伤。Takehiko 等^[10]和 Tsutomu 等^[11]分析了糖类对水溶液冰晶生长抑制作用的机理。Yoshikazu 等^[12]和 Tadanori 等^[13]研究了海藻糖和过冷溶液中冰晶的生长和形貌。Wang 等^[14]也研究了 PVA 和 PEG 对丙三醇溶液冰晶成核和生长的抑制作用。陶乐仁等^[15-17]和李方方等^[18]研究了 DMSO、蔗糖和纯水等溶液的冻结过程,研究结果表明:成核条件、降温速率、溶质分子的结构和过冷度等都对冰晶的生长属性有很大影响。华泽钊等^[19]和龚束芳等^[20]的结论是溶液的种类影响冰晶的形态。

成功的玻璃化低温保存,除了在降温过程中要避免结晶固化,还应在复温过程中避免反玻璃化,即避免由玻璃态向晶态的转变。而国内外对复温过程中反玻璃化结晶的显微研究甚少。质量浓度为 50% 的丙三醇溶液避免反玻璃化结晶的临界升温速率为 $2.63 \times 10^5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ ($T_d = T_m - 5 \text{ }^\circ\text{C}$)^[1],而在融化过程中,由于槽温受到生物样品的限制,一般不高于 $36 \sim 42 \text{ }^\circ\text{C}$,因此复温速率不高。添加纳米微粒有望为提高复温速率提供一种可能,将纳米微粒添加到不同种类低温保护剂中,对其反玻璃化过程中冰晶图谱和冰晶分数等属性的显微研究还未见报道。利用低温显微镜研究了含有不同粒径(20nm、40nm、60nm)和不同质量浓度(0.1%、0.5%)HA 纳米微粒的丙三醇和 PEG-600 溶液在反玻璃化过程中的结晶现象。从纳米微粒和低温保护剂类别两方面对反玻璃化过程中冰晶图谱、冰晶分数、生长速率以及形貌影响的角度来深入了解复温过程中水分子结晶的物理机理,分析影响冰晶生长属性的各个因素以寻找抑制冰晶生长的手段,这对于研究低温保护剂溶液复温再结晶的预防措施,降低低温保存过程中冰晶的损伤,进而提高

存活率具有非常重要的意义。

1 实验材料与方法

1.1 材料

丙三醇(Glycerol)(上海高信化玻仪器有限公司)为实验用分析纯试剂,纯度>99.8%。聚乙二醇(PEG-600),分析纯(上海国药集团化学试剂有限公司)和纯度为 99.99% 的羟基磷灰石(HA)纳米微粒,粒径分别为 20nm、40nm 和 60nm(南京埃普瑞纳米材料有限公司)。标定用水和溶液配制用水均为实验室自制二次蒸馏水,并用 0.2 μm 微孔滤纸过滤去除杂质。

1.2 方法

1.2.1 纳米低温保护剂的制备

实验采用两步法制备纳米低温保护剂。使用电子天平分别称取一定量的丙三醇、聚乙二醇(PEG-600)和蒸馏水,置于分散瓶中,配置成一定质量浓度的低温保护剂溶液。然后再分别称取不同粒径(20nm、40nm、60nm)、一定质量的纳米粉体加入分散瓶中,使纳米低温保护剂溶液的质量浓度为 0.1% 和 0.5%。调节 JY92-2D 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司)的设定值及水浴循环系统的温度值,使之符合纳米低温保护剂的制备条件。将配置好的含有纳米低温保护剂溶液的分散瓶放入超声波细胞粉碎机中振荡一定时间,使纳米粉体均匀的分散于低温保护剂中,制备出如表 1 所示 12 种组分的纳米低温保护剂溶液,每一种组分用表中字母表示。将未添加纳米微粒的丙三醇和 PEG-600 溶液的组分分别用字母 B₀和 C₀表示。

表 1 纳米低温保护剂溶液的种类

Tab.1 Different types of cryoprotectant solutions with HA nanoparticles

种类 粒径/nm	丙三醇		PEG-600	
	0.1%	0.5%	0.1%	0.5%
20	A ₁	B ₁	C ₁	D ₁
40	A ₂	B ₂	C ₂	D ₂
60	A ₃	B ₃	C ₃	D ₃

1.2.2 低温显微镜系统的装配

为了动态地观察纳米低温保护剂溶液的反玻璃化现象,我们装配了低温显微镜系统如图 1 所示。该系统使用了 linkam 公司的低温台(BCS196 Biological Cryo-stage),软件为 Llnksys32,控温系统为 T

95linkam,可以在 $-196^{\circ}\text{C} \sim 125^{\circ}\text{C}$ 范围内,以 $0.01 \sim 150^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率实现样品的冷冻及复温。低温载物台置于显微镜物镜下,CCD 摄像头采集图像并传递至计算机,温控系统和液氮泵可以控制低温台的温度变化。通过显微镜系统可以直接观察和摄录实验样品在冷冻、复温过程中的冰晶形态变化以及溶液的相变过程,并由计算机实时显示。结合图像采集及处理技术,可以对冷冻、复温过程进行定性及定量研究。

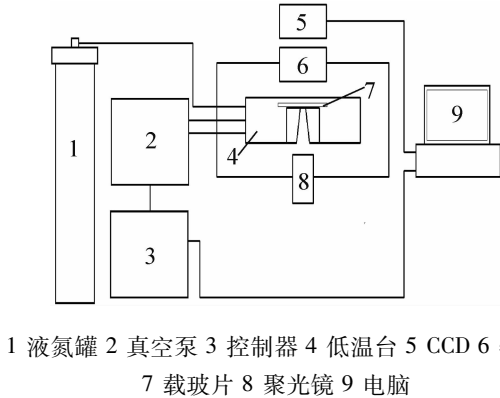


图 1 低温显微镜系统

Fig. 1 Schematic illustration of the cryomicroscopy system

1. 2. 3 冰晶图谱、冰晶分数、生长速率和形貌的分析

所有的纳米低温保护剂溶液均现配现用。将纳米低温保护剂以 $150^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的降温速率由室温降至 -160°C ,等温 2min,然后以 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的复温速率升温至室温。徐海峰等^[21]的实验工艺与我们一样,其结果表明实验条件下的冷却过程中实现了部分玻璃化。通过低温显微镜系统记录升温过程中冰晶图谱、冰晶分数、生长速率和形貌等属性随温度的变化。将冰晶长满至整个画面或停止生长的即时温度记为冰晶生长的终止温度。由于是同一厚度,冰晶分数记为冰晶总面积与观察总面积的比值。由于复温速率 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 恒定,因此通过记录反玻璃化过程中的温度,便可计算出时间。显微镜系统图像采集的温度间隔为 1°C ,冰晶的生长速率为平均生长速率,即为冰晶直径的差与时间的比值。通过显微镜系统和计算机的图像采集卡可以清楚地观察冰晶的形貌变化。

2 结果与讨论

通过低温显微镜系统分别记录了未添加纳米微粒和加入不同粒径 (20nm、40nm、60nm) 和不同质量浓度 (0.1%、0.5%) HA 纳米微粒的丙三醇和 PEG-600 溶液在反玻璃化过程中的结晶现象。丙三醇和 PEG-600 溶液在反玻璃化过程中具有代表性的冰晶图谱分别如图 2 和图 3;其中冰晶图谱上方的字母代表了溶液的种类,左边显示的是对应于右边图谱的温

度。冰晶分数分别如图 4 和图 5;生长速率分别如图 6 和图 7。

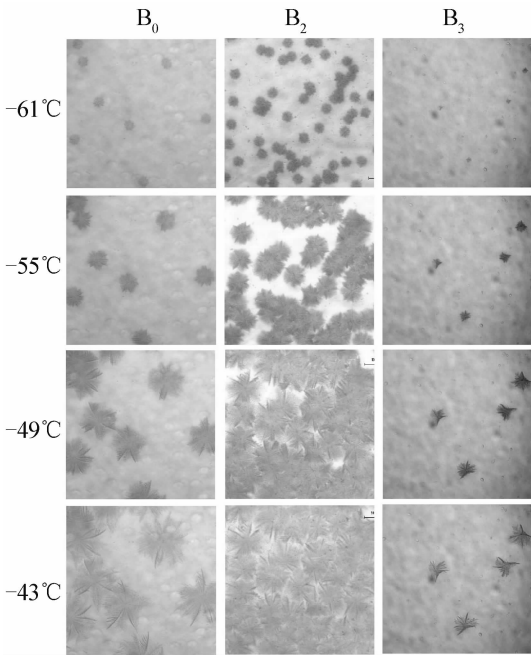


图 2 丙三醇溶液反玻璃化结晶图

Fig. 2 Microphotographs of devitrification crystallization in glycerol solutions

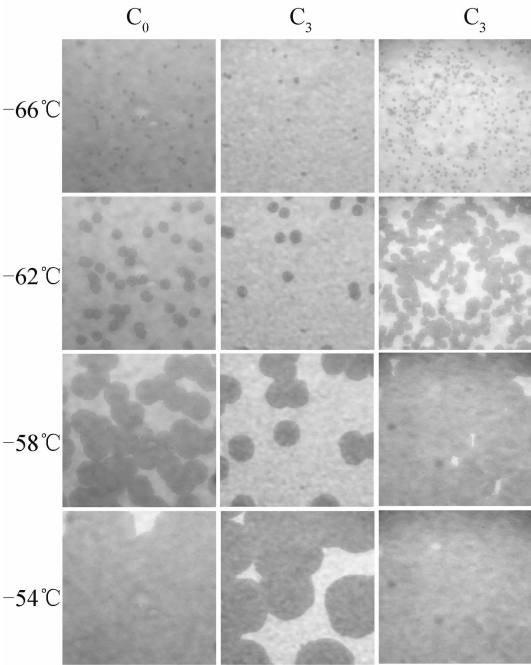


图 3 PEG-600 溶液反玻璃化结晶图

Fig. 3 Microphotographs of devitrification crystallization in PEG-600 solutions

2. 1 不同低温保护剂种类对冰晶形貌的影响

图 2 和图 3 显示,丙三醇溶液在反玻璃化过程中的冰晶形貌为枝状,而 PEG-600 溶液在反玻璃化过程中的冰晶形貌为球形,且两者冰晶的形貌都不随添

加纳米微粒粒径和质量浓度的不同而改变。丙三醇为渗透性低温保护剂,PEG-600 为非渗透性低温保护剂(大分子结构),由于不同溶液的种类对冰晶生长形态有着比较大的影响,溶质分子与水的相互作用不同影响水分子(簇)加入到冰晶晶格中来的过程,从而导致不同的冰晶形态,这里的结论与陶乐仁等^[17]的研究结果相一致。华泽钊等^[19]和龚束芳等^[20]的实验也证明了这一点,即冰晶形态与生长的状况与溶液的种类有关。同时,由于添加纳米微粒的浓度较小,仅为 0.5%,还不足以对冰晶的形貌产生影响,冰晶的形貌主要由低温保护剂的种类和溶液中溶质分子的结构及属性等因素决定。

2.2 不同纳米微粒和低温保护剂种类对冰晶分数的影响

图 4 显示,丙三醇溶液反玻璃化过程中,析出的冰晶分数不断增加。一开始冰晶分数增加显著,随着温度的继续升高,增加趋于平缓,直至反玻璃化结束。添加 20nm 的 HA 纳米微粒,纳米微粒的质量浓度对冰晶分数的影响不大。添加 40nm 纳米微粒,质量浓度为 0.5% 的纳米低温保护剂溶液相比质量浓度为 0.1% 的溶液,析晶分数显著增加,在 -43℃ 时,质量浓度为 0.5% 溶液的析晶分数为 0.1% 的 2.9 倍。添加 60nm 纳米微粒,结果与添加 40 nm 的情况正好相反,质量浓度为 0.5% 的析晶分数比质量浓度为 0.1% 的显著减少,在 -43℃ 时,质量浓度为 0.5% 的析晶分数仅为 0.1% 的 1/3。与未添加纳米微粒的丙三醇溶液相比,添加 60nm 纳米微粒的丙三醇溶液的析晶分数显著减少,其中质量浓度为 0.5% 的析晶分数仅为未添加纳米微粒溶液的 1/7。这一点对低温保存特别有利,因为在低温保存中,析出的冰晶分数对低温保存的存活率有着至关重要的影响。冰晶不仅会产生致命的机械损伤,伴随着冰晶的产生,未冻相的浓度增加,导致溶液的高浓度毒性损伤和渗透压损伤等,大大降低了低温保存的存活率。

由图 5 可以看出,与丙三醇溶液的变化趋势一样,PEG-600 溶液在反玻璃化过程中,随着温度的升高,析出的冰晶分数不断增加,最后都生长至整个观察视野,即冰晶分数为 1。在反玻璃化一开始和结束阶段,冰晶生长缓慢,而在 -64℃ 至 -52℃ 区间内,析晶分数显著增加。在此区间内,添加 40nm、0.5% 纳米微粒溶液的析晶分数增加了 90%。

在快速冻结过程中,由于降温速率达 150℃/min,形成的玻璃态中的细小晶核来不及长大,但在复温过程中,由于复温速率为 10℃/min,这些晶核会进一步长大,从而产生冰晶损伤。不同粒径和质量浓度

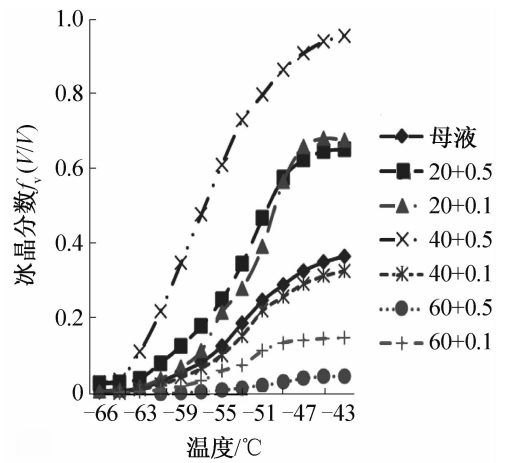


图 4 丙三醇冰晶分数图谱
Fig. 4 Diagram of ice fraction in glycerol solutions

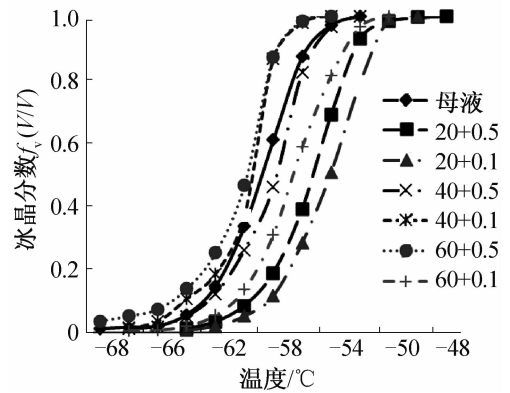


图 5 PEG-600 冰晶分数图谱
Fig. 5 Diagram of ice fraction in PEG-600 solutions

的纳米微粒会影响冻结过程中形成的玻璃态。在反玻璃化过程中,析出冰晶的多少与原有玻璃态密切相关。随着冰晶的析出,基体相的组分也在不断变化,由此产生了冰晶分数随纳米微粒粒径和质量浓度、溶液的种类以及温度的差异。

2.3 不同纳米微粒和低温保护剂种类对冰晶生长速率的影响

从图 6 可以看出,丙三醇溶液反玻璃化过程中,冰晶的生长速率图谱中存在双峰现象:即冰晶的生长速率存在两个极大值。随着反玻璃化的进行,冰晶逐渐长大,冰晶与玻璃相的接触面积增大,冰晶的生长速率加快,出现第一个极大值,这一结果与陶乐仁等^[17]的 DMSO 冻结过程的结论相同。由于溶液中晶核较多,随着冰晶的生长,冰晶直径达到一定程度,冰晶之间相互接触,原来自由生长的单个冰晶,变成了同时由界面动力学控制的冰晶生长模式,冰晶之间相互挤压,会对冰晶生长产生抑制作用,因此冰晶生长速率会减慢;同时,随着冰晶的继续长大,冰晶与玻璃相的接触面积也增大,冰晶的生长速率可能又会加

快。如果冰晶生长速率加快的效果大于抑制的效果,冰晶的生长速率会出现第二个极大值。冰晶的最终生长速率由晶核的数量、冰晶的直径、界面动力学和溶液的种类等因素共同决定。

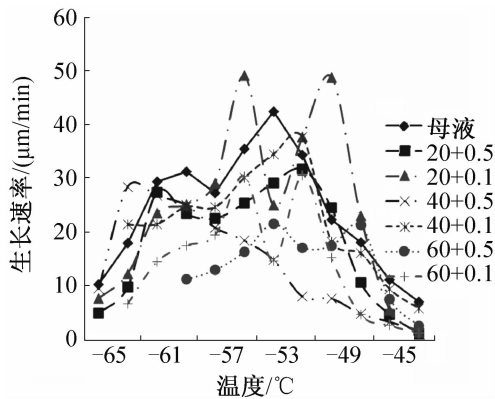


图 6 丙三醇冰晶生长速率图谱

Fig. 6 Diagram of ice growth rate in glycerol solutions

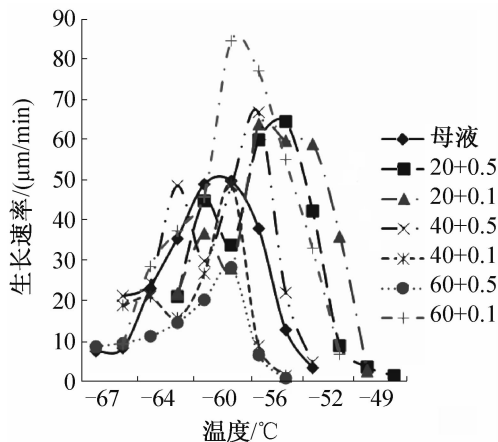


图 7 PEG-600 冰晶生长速率图谱

Fig. 7 Diagram of ice growth rate in PEG-600 solutions

添加 40nm、0.5% 纳米微粒的丙三醇溶液的冰晶生长速率图谱中没有出现双峰现象:对照冰晶分数图谱 4,我们可以发现,添加 40nm、0.5% 纳米微粒的丙三醇溶液中,存在大量晶核。因此,随着温度的升高,冰晶的生长,冰晶生长速率出现第一个极大值。由于存在大量的晶核,很快就会出现晶体间的相互接触和挤压,由界面动力学控制的冰晶生长模式产生的抑制作用,大大超过了由于接触界面的增大产生的促进作用,由此导致了冰晶生长速率一直减小,没有出现第二个极大值,即只有单峰。

相比其他溶液,添加 20nm、0.1% 纳米微粒的丙三醇溶液的冰晶生长速率极大值最大,为 $49.26\mu\text{m}/\text{min}$,而添加 60nm、0.5% 纳米微粒的丙三醇溶液的冰晶生长速率极大值最小,则为 $21.56\mu\text{m}/\text{min}$ 。

同样,由图 7 可以看出,未添加和添加 60nm 纳

米微粒的 PEG-600 溶液的冰晶生长速率图谱只有单峰。添加 60nm、0.1% 纳米微粒的 PEG-600 溶液的冰晶生长速率极大值最大,为 $83.99\mu\text{m}/\text{min}$,而添加 60nm、0.5% 纳米微粒的 PEG-600 溶液的冰晶生长速率极大值最小,则为 $28.13\mu\text{m}/\text{min}$ 。由于在反玻璃化结束时,冰晶都生长至整个观察视野,即冰晶分数为 1,因此添加 60nm、0.5% 纳米微粒的 PEG-600 溶液的晶核数最多,这一点也可以由冰晶图谱 3 看出。

添加不同粒径和质量浓度的纳米微粒,改变了溶液的组份和传热传质效率。反玻璃化过程中冰晶的生长速率与晶核的形成和传热传质过程密切相关。添加纳米微粒增加了溶液的异相成核,并提高了溶液的传热系数,但纳米微粒同样对晶界的产生及冰晶的生长产生影响,从而影响反玻璃化过程中冰晶的生长速率,至于生长属性与溶液的组份、纳米微粒的粒径和质量浓度以及温度等因素的关联性,还有待进一步的实验和研究。

3 结论

实验结果表明:渗透性低温保护剂丙三醇(质量浓度为 60%)和非渗透性低温保护剂 PEG-600(质量浓度为 50%)溶液在反玻璃化过程中的冰晶形貌分别为枝状和球形,且两者冰晶的形貌都不随添加纳米微粒粒径和质量浓度的不同而改变。与未添加纳米微粒的丙三醇溶液相比,添加 60nm、0.5% 纳米微粒的丙三醇溶液的析晶分数仅为未添加溶液的 1/7。PEG-600 溶液在 $-64^{\circ}\text{C} \sim -52^{\circ}\text{C}$ 区间内的析晶分数显著增加,其中添加 40nm、0.5% 纳米微粒的 PEG-600 溶液的析晶分数增加了 90%。冰晶的生长速率存在两个极大值现象,而添加 40nm、0.5% 纳米微粒的丙三醇溶液、未添加和添加 60nm 纳米微粒的 PEG-600 溶液的冰晶生长速率都只有一个极大值。针对实验结果,从溶液的种类,添加的纳米微粒等方面做出了简单的定性解释与分析。但纳米低温保护剂溶液在反玻璃化过程中冰晶生长属性的研究还需结合分子学、物理化学、传热学以及建立相场模型来解释。

本文受上海市东方学者计划项目资助。(The project was supported by the Shanghai Oriental Scholars Program.)

参考文献

- [1] 华泽钊,任禾盛. 低温生物医学技术[M]. 北京:科学出版社,1994.
- [2] 李广武,郑从义,唐兵. 低温生物学[M]. 湖南:科学技术出版社,1998.
- [3] Masuda H, Ebata A, Teramae K, et al. Alteration of

- Thermal Conductivity and Viscosity of Liquid by Dispersing Ultra-fine Particles [J]. *Netsu Bussei*, 1993, 56(4): 227-231.
- [4] Eastman J A, Choi S U S, Li S, et al. Enhanced Thermal Conductivity Through the Development of Nanofluids [J]. *Journal of Heat Transfer*, 1997, 108(15): 3-11.
- [5] Lee S, Choi S U S, Li S, et al. Measuring Thermal Conductivity of Fluids Containing Oxide Nanoparticles [J]. *Journal of Heat Transfer*, 1999, 121(25): 280-289.
- [6] Hao Baotong, Liu Baolin, Rong Senjie, et al. Effect of HA nanoparticles on thermodynamic parameters of cryoprotective agent [J]. *Cryobiology*, 2009, 59(2): 409-410.
- [7] 徐海峰, 郝保同, 刘宝林, 等. 纳米低温保护剂导热机理分析 [J]. *低温物理学报*, 2011, 33(3): 227-230. (Xu Haifeng, Hao Baotong, Liu Baolin, et al. The analysis on thermal conductivity mechanism of nanocryoprotectant [J]. *Chinese Journal Of Low Temperature Physics*, 2011, 33(3): 227-230.)
- [8] Diller K R, Cravalho E G. A cryomicroscope for the study of freezing and thawing processes in biological cells [J]. *Cryobiology*, 1971, 7(4/5/6): 191-199.
- [9] Steponkus P L, Dowgert M F, Ferguson J R, et al. Cryomicroscopy of isolated plant protoplasts [J]. *Cryobiology*, 1984, 21(2): 209-233.
- [10] Takehiko Gonda, Tadanori Sei. The inhibitory growth mechanism of saccharides on the growth of ice crystals from aqueous solutions [J]. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, 2005, 51(1/2/3): 70-80.
- [11] Tsutomu Uchida, Masafumi Nagayama, Tamaki Shibayama, et al. Morphological investigations of disaccharide molecules for growth inhibition of ice crystals [J]. *Journal of Crystal Growth*, 2007, 299(1): 125-135.
- [12] Yoshikazu Teraoka, Akio Saito, Seiji Okawa. Ice crystal growth in supercooled solution [J]. *International Journal of Refrigeration*, 2002, 25(2): 218-225.
- [13] Tadanori Sei, Takehiko Gonda, Yoshiyasu Arima. Growth rate and morphology of ice crystals growing in a solution of trehalose and water [J]. *Journal of Crystal Growth*, 2002, 240(1/2): 218-229.
- [14] Hai-Yan Wang, Takaaki Inada, Kunio Funakoshi, et al. Inhibition of nucleation and growth of ice by poly(vinyl alcohol) in vitrification solution [J]. *Cryobiology*, 2009, 59(1): 83-89.
- [15] 陶乐仁, 华泽钊. 低温保护剂溶液结晶过程的显微实验研究 [J]. *工程热物理学报*, 2001, 22(4): 481-484. (Tao Leren, Hua Zezhao. A microscopic study of the crystallization in cryoprotectant agents [J]. *Journal of engineering thermophysics*, 2001, 22(4): 481-484.)
- [16] 王文华, 陶乐仁, 华泽钊. NaCl 水溶液结晶过程的显微实验 [C] // 中国工程热物理学会学术会议论文, 2002, 637-640. (Wang Wenhua, Tao Leren, Hua Zezhao. A microscopic study of the crystallization in NaCl solution [C] // *Proceeding of engineering thermophysics*, 2002, 637-640.)
- [17] 王文华, 陶乐仁, 华泽钊. 冻结过程中冰晶生长属性的实验研究 [C] // 中国工程热物理学会学术会议论文, 2003, 390-393. (Wang Wenhua, Tao Leren, Hua Zezhao. Microscopic study of crystal growth in cryo-preservation solution [C] // *Proceeding of engineering thermophysics*, 2003, 390-393.)
- [18] 李方方, 刘静, 乐恺. 细胞尺度冰晶生长行为的相场数值模拟 [J]. *低温物理学报*, 2008, 30(2): 171-175. (Li Fangfang, Liu Jing, Yue Kai. Numerical simulation on ice crystal formulation in cellular level based on phase field theory [J]. *Journal of Low Temperature Physics*, 2008, 30(2): 171-175.)
- [19] 华泽钊, 王奇凤. 临床医学中若干低温热物理问题的研究 [J]. *自然科学进展*, 2002, 12(12): 1240-1245. (Hua Zezhao, Wang Qifeng. Studies on some low temperature thermophysics problems in clinical medicine [J]. *Progress in natural science*, 2002, 12(12): 1240-1245.)
- [20] 龚束芳, 杨涛, 车代弟. 抗冻蛋白溶液中冰晶生长行为的研究 [J]. *上海交通大学学报(农业科学版)*, 2010, 28(3): 265-268. (Gong Shufang, Yang Tao, Che Daidi. Research on ice crystal growth of antifreeze protein solution [J]. *Journal of Shanghai Jiao Tong University (Agriculture Science)*, 2010, 28(3): 265-268.)
- [21] 徐海峰, 刘宝林, 郝保同, 等. 纳米低温保护剂水合及玻璃化性质的 DSC 研究 [J]. *低温物理学报*, 2011, 33(6): 458-462. (Xu Haifeng, Liu Baolin, Hao Baotong, et al. Hydration and vitrification properties of Nano-cryoprotectant solutions examined with DSC [J]. *Chinese Journal Of Low Temperature Physics*, 2011, 33(6): 458-462.)

作者简介

吕福扣(1979-),男,助理研究员,上海理工大学医疗器械与食品学院,021-55271200, E-mail: fukoulv@163.com。研究方向:生物材料低温保存。

About the author

Lü Fukou(1979-), male, Research Assistant, College of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for science and technology, 021-55271200, E-mail: fukoulv@163.com. Research fields: Cryopreservation of biomaterials.