

文章编号:0253 – 4339(2015) 03 – 0114 – 05
doi:10. 3969/j. issn. 0253 – 4339. 2015. 03. 114

低温保护剂与其分子中羟基排列的关系

杨波 刘宝林 李娟

(上海理工大学医疗器械与食品学院 上海 200093)

摘 要 为了研究低温保护剂与其分子结构的关系,实验采用差示扫描量热仪(Pyris-Diamond DSC),测量了七种低温保护剂(Me₂SO,葡萄糖,蔗糖,海藻糖,木糖醇,麦芽糖醇和山梨醇)的物理学特性参数(包括熔融温度、熔融峰面积和熔融热量等)及水合性质,通过熔融温度和熔融热量计算低温保护剂中未冻水份额,研究发现未冻水份额与物质的分子结构及低温保护效果存在一定的关系,即低温保护剂的保护效果,与其分子结构中羟基的线性排列正相关,线性排列中羟基的数目越多,低温保护效果越好。结论:在实验的七种低温保护剂中,山梨醇的分子结构中拥有 5 个羟基为最多,因此添加山梨醇的溶液低温保护效果最好。

关键词 低温保护剂;水合性质;多元醇;羟基

中图分类号:R318. 52

文献标识码: A

Relation on Cryoprotectants and Arrangement of Hydroxyl Groups

Yang Bo Liu Baolin Li Juan

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

Abstract In order to study the relationship between cryoprotective and its molecular structure, Pyris-diamond DSC was used in the experiment to study the physical properties of seven kinds of cryoprotective agent, including phase transition temperature, the area melting peaks phase, transition enthalpy value and hydration properties. The unfrozen water share of cryoprotectant was calculated by cooling curve of the phase transition temperature and that of the phase transition enthalpy value. We have discovered that there is a positive correlation between the protective effect of cryoprotectant and the linear arrangement of hydroxyl; the more hydroxyl in the linear arrangement, the better protective effect of cryoprotectant. As a result, the protective effect of cryoprotectant adding sorbitol solution is the highest in seven kinds of cryoprotective agent because sorbitol has five hydroxy.

Keywords cryopreservation; hydration properties; polyalcohols; hydroxyl

生物材料在低温保存中的降温 and 复温过程实质上是一个相当复杂的物理化学过程,包括降温过程中低温保护剂溶液的结晶固化,升温过程中结晶固化溶液的复温熔融以及溶液中冰晶的形成、生长和融化,这些过程与细胞复温后的存活率密切相关^[1-3]。在低温保存过程中,一般加入某些低温保护剂(CPA)减少或避免低温保存过程中对细胞的损伤。Meryman H T^[4] 在研究水溶液相变的特性时发现甘油和 Me₂SO 都能够防止共晶的形成,Nicolajsen H 等^[5] 在研究三元体系状态图时发现海藻糖可以抑制溶液共晶,Izutsu K 等^[6] 在文章中提到在向水溶液中加入糖和聚合物后溶液的共晶将受到抑制。

上述实验说明在低温保护剂中加入醇类或糖类,溶液的共晶现象可以被抑制。但 Touchell D H^[7] 发

现甘露醇和山梨醇以相同的浓度用在植物茎尖低温保存,复温后茎尖细胞的存活率却不一样。通过研究发现,虽然都是多元醇,但分子的结构,尤其是分子结构中的羟基排列方式不同,最终导致低温保护效果不同,说明低温保护剂的保护效果与添加物质的分子结构相关,但是目前这方面的研究非常少,仅有少量关于低温保护剂羟基和甲基的作用报道^[8-13],这些报道认为,低温保护剂的羟基能够与溶液中的水形成氢键,阻碍水分子的有序排列,起到弱化水的结晶的作用。

因此对于低温保护剂的种类、浓度及分子结构与低温保护效果的关系有待进一步研究。在低温生物学研究中,DSC 主要用于确定低温保护剂溶液的相变温度、相变过程中的焓变及相变前后的潜热变化,用

于判断溶液的固液相的转变等。本实验通过差式扫描量热法测出肝细胞低温保护剂溶液(Me₂SO, 葡萄糖, 蔗糖, 海藻糖, 木糖醇, 麦芽糖醇和山梨醇) 的物理学特性参数(包括熔融温度, 熔融峰面积, 熔融热量等), 通过熔融温度和熔融热量计算冻结水含量, 研究低温保护剂中未冻水份额, 分子结构与低温保护效果(细胞存活率) 的关联性以及机理分析。

1 实验材料和方法

1.1 材料

山梨醇和海藻糖为分析纯, 购于国药集团化学试剂有限公司。Me₂SO(无菌)、胎牛血清、1640 培养液等购于上海索莱宝生物科技有限公司。

1.2 实验仪器

电子天秤(Sartorius BP 211D, Germany), 液固通用压机(Perkin-Elmer, USA), 标准液体铝皿(Perkin-Elmer, USA), 差示扫描量热仪(Pyris-Diamond 型, USA) HHCP-01W 二氧化碳培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂), YXQ-LS-75SH 立式压力蒸汽灭菌器(上海博讯实业有限公司医疗设备厂), ECLIPSE 55i 显微镜(日本 Nikon), 超低温冰箱(美国 Harris 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 差示扫描量热仪

本实验测量温度范围为 - 80 ~ 40 ℃, 设定的实验程序为 40 ℃ 等温 1 min, 10 ℃/min 降温至 - 80 ℃, 等温 1 min, 10 ℃/min 升温至 40 ℃, 等温 1 min。每个样品都按照相同的降升温程序对样品皿、标准物质皿和空皿进行扫描, 然后再进行下一个样品, 所有热流信号均从 DSC 曲线上读得。

1.3.2 实验数据分析

采用热分析软件 Pyrissoftware (美国 Perkin-Elmer 公司, 5.0 版本), 读取相变温度与相变焓, 熔融温度取台阶上升沿斜率最大点和基线交点对应的温度, 称为外推起始温度(Onset), 该温度不易受测试条件的影响, 更接近热力学平衡温度。

1.3.3 低温保护剂的分子结构图

本文选择七种低温保护剂为研究对象, 这七种溶液的性质和分子简式如表 1 所示。

1.3.4 低温保护剂的配制

根据这七种物质的性质配制含有不同质量百分比浓度的 Me₂SO、糖和糖醇低温保护剂, 如表 2 所示。

2 结果和分析

差式扫描量热法是使样品处于程序控制的温度

表 1 糖和糖醇的分子结构
Tab. 1 Characteristics of sugars and polyalcohols

名称	种类	相对分子质量	分子式	每个分子中羟基的个数
葡萄糖	单糖	180	C ₆ H ₁₂ O ₆	5
蔗糖	双糖	342	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	8
海藻糖	双糖	342	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	8
山梨醇	多元醇	182	C ₆ H ₁₄ O ₆	6
麦芽糖醇	多元醇	344	C ₁₂ H ₂₄ O ₁₁	5
木糖醇	多元醇	152	C ₅ H ₁₂ O ₅	5
Me ₂ SO	—	78	C ₂ H ₆ OS	—

表 2 低温保护剂
Tab. 2 Cryoprotectant

组号	Me ₂ SO/ %	糖浓度/ (mol/L)	糖醇浓度/ (mol/L)
1	10	0	0
2	5	0	0
3	5	0.4 M 海藻糖	0
4	5	0.4 M 葡萄糖	0
5	5	0.4 M 蔗糖	0
6	5	0	0.4 M 山梨醇
7	5	0	0.4 M 木糖醇
8	5	0	0.4 M 麦芽糖醇

下, 观察样品和参比物之间的热流差随温度或时间的函数, 转变温度与转变焓的读取采用热分析软件。

2.1 低温保护剂熔融相变参数

根据 DSC 实验结果(如图 1 所示), 取台阶上升沿斜率最大点和基线交点对应的温度来推导熔融相变温度的初始温度, 读取熔融相变温度、熔融焓和峰面积, 汇总 DSC 升温过程的实验数据如表 3 所示。

从表 3 的实验数据可知, 10% Me₂SO 低温保护剂的熔融相变温度为 - 10.6 ~ - 0.45 ℃, 热焓值为 209.3 J/g, 5% Me₂SO 组的初始熔融相变温度为 - 7 ℃, 结束温度为 1.55 ℃, 熔融温度升高, 熔融过程的温度跨区更大, 与 10% Me₂SO 相比, 5% Me₂SO 熔融峰变宽, 峰面积增大, 热焓值增加, 说明 5% Me₂SO 溶液冰晶融化需要的热量多, 进一步说明 5% Me₂SO 溶液结晶过程中形成的冰晶较多; 而在低温保护剂中, 形成的冰晶越多, 对细胞的损害越大, 因此从熔融相变温度考虑, 10% Me₂SO 优于 5% Me₂SO。

表 3 不同配方低温保护剂的熔融相变温度、熔融焓和峰面积
Tab.3 T_f , ΔH and area of viarious cryopreserving solution

组号	名称	$T_f/^\circ\text{C}$	End/ $^\circ\text{C}$	$\Delta H_{(T_f)}/(\text{J/g})$	峰/ $^\circ\text{C}$	峰面积/ mJ
1	5% Me_2SO	-7.64	1.55	226.8	-1.83	2172
2	10% Me_2SO	-10.6	-0.45	209.3	-3.6	1926
3	葡萄糖	-8.74	0.48	261.5	-2.84	2700
4	蔗糖	-7.05	2.11	266.8	-0.98	2689
5	海藻糖	-9.0	-1.15	247.0	-3.56	1936
6	山梨醇	-8.81	-0.59	246.8	-3.35	2340
7	木糖醇	-8.38	-0.4	261.1	-2.91	2469
8	麦芽糖醇	-7.04	1.24	267.3	-1.78	2592

注:End 为熔融相变温度的结束温度。

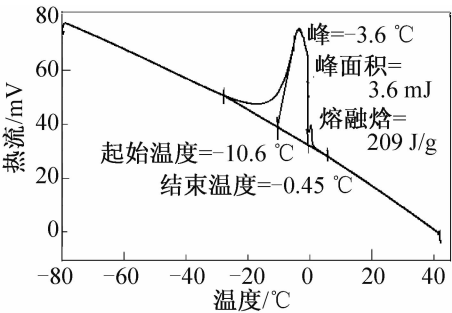


图 1 10% Me_2SO 溶液的升温过程 DSC 热流曲线
Fig.1 DSC heating temperatures of 10% Me_2SO

由三种添加糖低温保护剂的数据可知,海藻糖的熔融相变温度 $-9.0 \sim -1.15^\circ\text{C}$,热焓值为 247 J/g ,峰面积在三种糖中最小,蔗糖熔融相变温度为 $-7.05 \sim 2.11^\circ\text{C}$,热焓值为 261.5 J/g ,葡萄糖熔融相变温度 $-8.47 \sim 0.48^\circ\text{C}$,热焓值为 266.8 J/g ,海藻糖相比蔗糖和葡萄糖的熔融温度低,热焓值小,同时峰面积最低,说明在三种糖的低温保护剂中,海藻糖的数据最好。对三种添加糖醇的低温保护剂的比较中可知,山梨醇的熔融相变温度为 $-8.81 \sim -0.59^\circ\text{C}$,热焓值为 246.8 J/g ,木糖醇的熔融相变温度 $-8.38 \sim -0.4^\circ\text{C}$,热焓值 261.1 J/g ,麦芽糖醇 $-7.04 \sim 1.24^\circ\text{C}$,热焓值 267.3 J/g ,说明在添加三种糖醇的溶液中,含山梨醇的溶液优于其它两种。

综上所述,DSC 研究肝细胞低温保护剂溶液物理学特性参数(包括熔融温度,熔融峰面积,熔融热量等),可以从理论上对细胞低温保护剂的选择起参考和指导作用。

2.2 低温保护剂的水和性质

与纯水相比,低温保护剂溶液的冻结焓降低,溶液的冻结焓降低表现了低温保护剂对结晶过程的抑

制,其中主要有两方面的因素:一是低温保护剂(溶质)占据了本该参与相变的纯水份额;二是有一部分水与低温保护剂之间以氢键的形式相联系,成为不冻水,不冻水份额的高低反映了低温保护剂结合水能力的强弱^[14]。用 DSC 研究水合性质是通过测量溶液中可冻水的结晶焓和熔融焓实现的。实验根据公式计算每种低温保护剂的未冻水份额,公式如下:

$$\mu = 1 - \frac{\Delta H(T_f)_{\text{DSC}}}{\Delta H(T_f)}$$

式中: μ 表示溶液中未冻水的份额; $\Delta H(T_f)_{\text{DSC}}$ 是 DSC 测得的溶液在温度 T_f 下的相变焓, J/g ; $\Delta H(T_f)$ 在温度 T_f 下的相变焓, J/g ;将其数据代入公式中计算得到每种低温保护剂在 T_f 下的未冻水份额,数据如表 4 所示,将低温保护剂的分子结构中羟基的排列和个数及冻结水含量的数据总结在表 4 中。

根据 Brian W 等^[15]的观点:在溶液中,羟基基团与水分子之间形成氢键,从而把溶液中的自由水变为束缚水,因此减少了溶液中的水分子,降低溶液中可冻水的份额,减少了溶液中冰晶的形成。在上述物质中, Me_2SO 、海藻糖、蔗糖排列结构比较复杂,没有显著碳链骨架,羟基成零散排列,因此无法进行正常比较;葡萄糖、木糖醇、麦芽糖醇、山梨醇分子中都有较长的碳链(6C),所有的羟基都是沿着碳链排列,葡萄糖分子结构中一边有四个羟基,木糖醇分子结构有四个羟基,山梨醇分子结构有五个羟基,而麦芽糖醇分子结构一边只有三个羟基,按照 Brian W 等^[15]的观点,麦芽糖醇的羟基最少,未冻水份额最小为 0.16,因此添加麦芽糖醇的保护剂溶液低温保护效果最差,是八种低温保护剂中最低的;山梨醇拥有的羟基最多,未冻水份额为 0.22,添加山梨醇的保护剂溶液低温保护效果最高,对细胞损害也最小,是八种低温保

护剂中最高的,与 Brian W 等^[15]的观点相符。葡萄糖和木糖醇虽然都有四个羟基,但葡萄糖有碳氧键,羟基排列不对称,增加了保护剂自身或者保护剂之间键合的概率,从而弱化了对水的束缚能力。木糖醇羟基两两对称,减少了保护剂自身或者保护剂之间的键

合的概率,正是由于这样的分子内部结构,使得木糖醇自身键合的概率明显降低;反过来,与水键合的可能性也就大大增加了,因此可冻结水的含量稍低于葡萄糖,添加木糖醇的低温保护效果要高于葡萄糖。

表 4 低温保护剂在 T_f 下的未冻水份额、羟基的排列及个数与细胞存活率的关系
Tab. 4 Relationship between share of unfrozen water of cryoprotectant and OH arrangement and survival in T_f

组号	低温保护剂	总羟基个数	一边羟基的个数	羟基排列	未冻水份额
1	10% Me ₂ SO	—	—	—	0.33
2	5% Me ₂ SO	—	—	—	0.29
3	5% Me ₂ SO + 0.4 M 海藻糖	8	—	非线性排列	0.22
4	5% Me ₂ SO + 0.4 M 蔗糖	8	4	非线性排列	0.17
5	5% Me ₂ SO + 0.4 M 葡萄糖	5	—	线性排列	0.17
6	5% Me ₂ SO + 0.4 M 木糖醇	5	4	线性排列	0.18
7	5% Me ₂ SO + 0.4 M 麦芽糖醇	5	3	线性排列	0.16
8	5% Me ₂ SO + 0.4 M 山梨醇	6	5	线性排列	0.22

通过实验发现:低温保护剂溶液中添加物质分子结构中的羟基和 DSC 实验计算的可冻结水含量及未冻水份额有关,而未冻水份额与复温后细胞存活率密切相关;因此在低温保护剂添加物质的筛选中,第一,可以先从物质的分子结构入手,观察线性羟基数量的排列,选择羟基数量多的物质;第二,通过 DSC 实验得出低温保护剂溶液的相变转变温度、熔融焓值等,计算溶液中的可冻水份额,从理论上得出低温保护剂效果最好的低温保存液。

3 结论

为了说明低温保护剂与添加物质的分子结构的关系,本文采用实验的方法,首先挑选了七种常用并且有代表性的低温保护剂(Me₂SO、葡萄糖、蔗糖、海藻糖、木糖醇、麦芽糖醇和山梨醇),用 DSC 研究其物理学特性参数,根据溶液的熔融温度和熔融峰的数值,发现添加山梨醇的低温保护液后,熔融温度低,峰面积最小,因此低温保护效果最好。

第二个实验,利用 DSC 测定的熔融焓,计算未冻水份额,而未冻水份额与羟基的排列数目相关。因此根据实验结果我们可以得出各种低温保护剂在水合性质上所表现出的差异,体现了保护剂分子结构中的官能团羟基所起到的作用,即随着分子结构中线性羟基排列数目的增加,冻结水份额降低,低温保护效果增强。

总之,低温保护剂对细胞或组织的低温保存效果

是一个复杂的体系,细胞低温保存是一项复杂的过程,因此在筛选低温保护剂时,首先从分子结构出发,以理论计算结果去选择,然后再在实际的实验中去摸索,逐步寻找低温保存的规律,优化低温保存方案,最终为不同的细胞组织,选择最合适的低温保护剂。

参考文献

[1] Macfarlane D R. Physical aspects of vitrification in aqueous solutions[J]. Cryobiology, 1987, 24(3): 181-195.

[2] Macfarlane D R, Forsyth M. Recent insights on the role of cryoprotective agents in vitrification [J]. Cryobiology, 1990, 27(4): 345-358.

[3] Vigier G, Vassoille R. Ice nucleation and crystallization in water-glycerol mixtures[J]. Cryobiology, 1987, 24(4): 345-354.

[4] Meryman H T. The interpretation of freezing rates in biological materials[J]. Cryobiology, 1966, 2(4): 165-235.

[5] Nicolajsen H, Hvidt A. Phase behavior of the system trehalose-NaCl-water [J]. Cryobiology, 1994, 31(2): 199-205.

[6] Izutsu K, Yoshioka S, Takeda Y. The effects of additives on the stability of freezed-dried β-galactosidase stored at elevated temperatures[J]. International Journal of Pharmaceutics, 1991, 71(1/2): 137-146.

[7] Touchell D H. Principles of cryobiology for conservation of threatened species [D]. Western Australia: University of Western Australia, 1995.

[8] Wowk B, Darwin M, Harris S B, et al. Effects of solute me-

- thoxylation on glass-forming ability and stability of vitrification solutions[J]. *Cryobiology*, 1999, 39(3): 215-231.
- [9] 胡桐记, 周国燕, 高才, 等. 低温保护剂溶液固化性质的 DSC 研究[J]. *制冷学报*, 2005, 26(3): 38-46. (Hu Tongji, Zhou Guoyan, Gao Cai, et al. Solidification properties of polyalcohols aqueous solution studied by DSC[J]. *Journal of Refrigeration*, 2005, 26(3): 38-46.
- [10] Fahy G M, Levy D I, Ali S E. Some emerging principles underlying the physical properties biological actions and utility of vitrification solutions[J]. *Cryobiology*, 1987, 24(3): 196-213.
- [11] 胡桐记, 高才, 周国燕, 等. 保护剂溶液水合和玻璃化性质的 DSC 研究[J]. *上海理工大学学报*, 2005, 27(5): 381-384. (Hu Tongji, Gao Cai, Zhou Guoyan, et al. Hydration and glass transition properties of polyalcohols aqueous solution examined with DSC[J]. *Journal of University of Shanghai for Science and Technology*, 2005, 27(5): 381-384.
- [12] Kasaim M. Cryopreservation of mammalian embryos[J]. *Molecular Biotechnology*, 1997, 7(2): 173-179.
- [13] Cabrita E, Robles V, Chereguini O, et al. Effect of different cryoprotectants and vitrificant solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Cryobiology*, 2003, 47(3): 204-217.
- [14] 高才, 王文华, 胡桐记, 等. 不同结晶度的乙二醇及其水溶液玻璃化转变与焓松弛[J]. *物理化学学报*, 2004, 20(7): 701-706. (Gao Cai, Wang Wenhua, Hu Tongji, et al. Glass transition and enthalpy relaxation behavior of ethylene glycol and its aqueous solution with different crystallinity[J]. *Acta Phys-Chimica Sinica*, 2004, 20(7): 701-706.
- [15] Brian W, Michael D. Effects of solute methoxylation on glass-forming ability and stability of vitrification solutions [J]. *Cryobiology*, 1999, 39(3): 215-231.
- 通信作者简介**
杨波, 女, 高级实验师, 上海理工大学医疗器械与食品学院, (021)55271208, E-mail: yangbo6899@126.com。研究方向: 食品的低温冻存, 细胞及组织的低温保存。
- About the corresponding author**
Yang Bo, female, senior technican, School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, + 86 21-55271208, E-mail: yangbo6899@126.com. Research fields: keep fresh and cryopreservation of food, cryopreservation cell.
-
- (上接第 96 页)
- [15] 郭长青. 壳板式蒸发式冷凝器热质传递性能及机理研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2009. 30-35.)
- [16] 董俐言, 王宝龙, 石文星. 板式蒸发式冷凝器传热传质的数值模拟[J]. *制冷学报*, 2013, 34(1): 10-17. (Dong Liyan, Wang Baolong, Shi Wenxing, et al. Numerical simulation on heat and mass transfer of plate evaporative condenser[J]. *Journal of Refrigeration*, 2013, 34(1): 10-17.)
- [17] 李泰宇, 欧阳新萍. 一种全管束配水的蒸发式冷凝器及其风阻实验研究[J]. *制冷学报*, 2014, 35(2): 30-35. (Li Taiyu, Ouyang Xiping. Experimental study on air flow resistance of an evaporative condenser with water distributed on every tube[J]. *Journal of Refrigeration*, 2014, 35(2): 30-35.)
- 通信作者简介**
申江, 男, 教授, 天津商业大学机械工程学院院长, 机械工程学院制冷系, (022)26669745, E-mail: shenjiang@tjcu.edu.cn。研究方向: 食品冷链技术, 制冷系统优化及节能技术等。
- About the corresponding author**
Shen Jiang, male, professor, Dean of Mechanical Engineering School, Department of Refrigeration Technology, Tianjin University of Commerce, + 86 22-26669745, E-mail: shenjiang@tjcu.edu.cn. Research fields: food cold chain technology, optimization and conservation technology of refrigeration systems.