

文章编号:0253-4339(2020)06-0159-08

doi:10.3969/j.issn.0253-4339.2020.06.159

氨基酸类保护剂的冻结特性及抑制冰晶机理研究

李鑫 胥义

(上海理工大学生物系统热科学研究所 上海 200093)

摘要 本文借助差式扫描量热法(DSC)研究了降温速率(5、10、20、50、100 °C/min)和溶液浓度(0.5、1、2、3、4 mol/L)对L-赖氨酸、L-脯氨酸、甘氨酸和L-丝氨酸等典型氨基酸类保护剂热物性参数的影响。研究表明:溶液浓度对低温保护剂溶液热物性参数的影响比降温速率的影响更加显著;在低溶液浓度(0.5 mol/L和1 mol/L)条件下,L-脯氨酸的未冻水含量高于其它3种氨基酸,表明在低浓度溶液中,L-脯氨酸的结合水能力更强;在高溶液浓度(2 mol/L和3 mol/L)条件下,L-赖氨酸的未冻水含量高于其它3种氨基酸,因为在相同浓度溶液中,L-赖氨酸官能团浓度高于其它3种氨基酸,且其分子链较长,官能团自键合概率低,对冰晶抑制效果更强,表现出更高的未冻水含量。

关键词 热物性参数;差示扫描量热法;氨基酸类保护剂;抑制冰晶;未冻水含量

中图分类号:R318.52;TB61⁺1

文献标识码:A

Study on Freezing Characteristics of Amino Acid Protectors and the Mechanism of Ice Crystal Inhibition

Li Xin Xu Yi

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

Abstract The effects of cooling rates (5, 10, 20, 50, 100 °C/min) and solution concentration (0.5, 1, 2, 3, 4 mol/L) on the thermo-physical parameters of typical amino acid aqueous solutions, such as L-lysine, L-proline, glycine, and L-serine, were investigated via differential scanning calorimetry (DSC). The results indicated that the effect of solution concentration on thermos-physical parameters of cryoprotectant solution was more significant than that of the cooling rate. At low concentrations (0.5 mol/L and 1 mol/L), the unfrozen water content of L-proline was higher than that of other three amino acids. This indicates that the water-binding capacity of L-proline was higher than that of other three amino acids in low concentration solution. At high concentrations (2 mol/L and 3 mol/L), the unfrozen water content of L-lysine was higher than that of the other three amino acids. Given that the concentration of the L-lysine functional group is higher than the other three amino acids in the same concentration solution and the longer molecular chain thereof leads to a lower probability of self-bonding of the functional group, a higher unfrozen water content was exhibited in the solution system.

Keywords thermophysical parameters; differential scanning calorimetry (DSC); amino acid cryoprotectants; ice crystals inhibition; unfrozen water content

低温保存是细胞、组织或器官长期保存最常用的方式^[1-2]。然而生物样本在冻存过程中会受到损伤,为避免或减小这种低温损伤,一般会在低温保存过程中添加低温保护剂(cryoprotective agent, CPA)。常用的低温保护剂二甲基亚砜具有细胞毒性^[3-6],甘油渗透性差^[7-8],因此寻找低毒性或无毒性保护剂成为重要课题。研究者试图寻找一些天然物质作为低温保护剂,如抗冻蛋白、小分子糖类和氨基酸等,但是抗冻

蛋白合成过程复杂,自生物体内的提取量也极少,广泛应用难度大^[9-11];小分子糖类不能透过细胞膜进入细胞内部,细胞冻存效率较低^[12-13];而氨基酸种类繁多,来源广泛,并且对生物样本无明显毒性,这使得氨基酸可以应用于低温保存中。Zhang Lu等^[14]研究表明L-脯氨酸可以作为玻璃化溶液的重要成份保存小鼠的卵母细胞实现高存活率,并保护了细胞的线粒体功能;Cao Xinyan等^[15]表明含有甘氨酸的玻璃化溶

液复温后,可以减少玻璃化诱导的渗透压并促进小鼠卵母细胞的发育。目前有关典型氨基酸类低温保护剂冻融特性的研究较少,不利于开发基于氨基酸类的低温保护剂。

本文借助差式扫描量热仪(DSC)研究了天然氨基酸中的 L-赖氨酸、L-脯氨酸、甘氨酸和 L-丝氨酸水溶液的成核温度、结晶焓和冰点温度随溶液浓度及降温速率的变化规律,获得了 4 种氨基酸低温保护剂水溶液的未冻水含量,并分析了氨基酸类保护剂与水分子的作用机理。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

L-赖氨酸(L-Lysine)、L-脯氨酸(L-Proline)、甘氨酸(Glycine)、L-丝氨酸(L-Serine)均购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.2 试验仪器

差示扫描量热仪(DSC8500,美国 PE 公司),工作温度范围为 $-170\sim 730\text{ }^{\circ}\text{C}$,升降温扫描速率为 $0.01\sim 750\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$,温度精度为 $0.01\text{ }^{\circ}\text{C}$,热焓精度为 $99.999\ 9\%$,每次测试前要提前标定温度和热焓。

ME 分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),最大称量值为 120 g ,精度为 0.1 mg ,使用前需要进行校正。

Lab Dance 旋涡混合器(德国 IKA 公司),固定转速为 $2\ 800\text{ r}/\text{min}$,用于振荡直径 $\leq 30\text{ mm}$ 的容器,如小尺寸试管、离心管等。

1.3 试验溶液配制

用 ME 分析天平称量确定质量的 L-赖氨酸、L-脯氨酸、甘氨酸、L-丝氨酸,用移液枪量取确定体积的 DMSO 分别溶于蒸馏水中,充分震荡 $2\sim 3\text{ min}$ 得到不同浓度($0.5, 1, 2, 3, 4\text{ mol}/\text{L}$)的 L-赖氨酸、L-脯氨酸、甘氨酸、L-丝氨酸和 DMSO 溶液样品(本研究中溶液浓度均为摩尔浓度, mol/L)。由于甘氨酸和 L-丝氨酸的 $4\text{ mol}/\text{L}$ 水溶液溶质无法完全溶解,故无 $4\text{ mol}/\text{L}$ 的试验数据, L-赖氨酸的 $4\text{ mol}/\text{L}$ 水溶液在降温过程中实现了玻璃化,故图 1、图 2、图 3 和表 1 中无部分数据。制备好的溶液样品用于降温和复温过程的扫描量热试验。

1.4 试验方法

采用 DSC8500 进行连续扫描,为了消除样品的热历史,加样后首先以 $100\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 快速升温至所需温度区间的上限,然后以 $100\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 快速降温至所需温度区间的下限,如此重复 $2\sim 3$ 次,然后调整温度

至 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$,并等温 2 min ,待热流稳定后开始试验。将样品从 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 分别以 $5, 10, 20, 50, 100\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 连续降温至 $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$,然后等温 2 min ,继续以 $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 连续升温至 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$,再等温 2 min ,完成一次数据采集。每种样品做 3 个平行样,每个样重复 3 次,以保证数据的可靠性。

1.5 数据分析

转变温度与转变焓的读取采用 DSC8500 配套使用的热分析软件 Pyris Software。在相变前后比热变化较小时,采用标准基线;变化较大时,使用“S”形基线^[16]。在取试验结果时,将每个浓度的数据中的最大值和最小值剔除,取剩余数据的平均值作为分析依据,并在必要时注明数据的波动范围。

2 试验结果与讨论

低温保护剂的加入会抑制冰晶的形成,具体表现为影响水溶液的成核温度、结晶焓、冰点温度及熔融焓等基本热物性参数^[17]。本研究将 L-赖氨酸、L-脯氨酸、甘氨酸及 L-丝氨酸水溶液进行对比,分析溶液浓度和降温速率对氨基酸水溶液热物性的影响。

2.1 溶液浓度对溶液冻结过程热物性的影响

据文献发现 $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的升降温速率较贴合实际低温保存过程,故在研究溶液浓度对保护剂溶液热物性参数的影响时,升降温速率均选择 $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。

图 1 所示为不同浓度的氨基酸和 DMSO 水溶液在 $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升降温速率下成核温度的变化。研究发现,在相同浓度下, DMSO 水溶液的成核温度和 4 种氨基酸溶液的成核温度差距很小,说明氨基酸降低成核温度的能力和 DMSO 相当。随着溶液浓度的增大,4 种氨基酸水溶液的成核温度均大幅降低,说明随着溶质浓度的增大,在降温过程中冰晶成核变困难,需要更大的过冷度才能结晶^[18]。甘氨酸和 L-丝氨酸水溶液浓度从 $0.5\text{ mol}/\text{L}$ 增至 $3\text{ mol}/\text{L}$,成核温度降低约 $5\text{ }^{\circ}\text{C}$; L-赖氨酸和 L-脯氨酸水溶液成核温度随浓度的增大而大幅降低, L-赖氨酸水溶液在浓度增大的过程中成核温度降低约 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, L-脯氨酸的成核温度降低约 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。说明溶液浓度对溶液成核温度的影响显著。

图 2 所示为不同浓度的氨基酸和 DMSO 水溶液在 $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升降温速率下结晶焓的变化。溶液浓度为 $0.5, 1\text{ mol}/\text{L}$ 时, DMSO 水溶液的结晶焓均大于 4 种氨基酸溶液,说明在这两个浓度下 DMSO 抑制冰晶的能力最弱;溶液浓度为 $2\text{ mol}/\text{L}$ 时, L-赖氨酸和 L-脯氨酸的结晶焓小于 DMSO 水溶液,甘氨酸的结晶焓大于 DMSO 水溶液, L-丝氨酸和 DMSO 水溶液

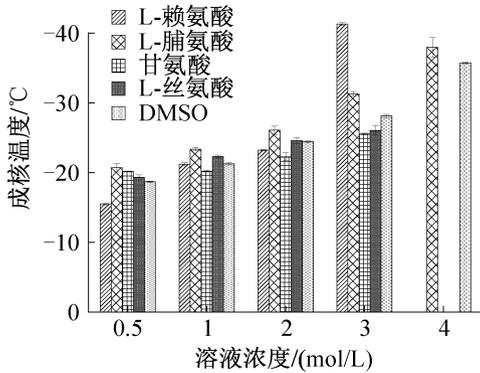


图 1 不同浓度氨基酸和 DMSO 水溶液的成核温度

Fig.1 Nucleation temperature of aqueous solution of amino acids and DMSO with different concentrations

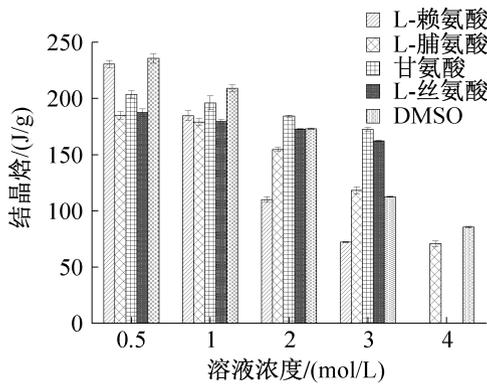


图 2 不同浓度氨基酸和 DMSO 水溶液的结晶焓

Fig.2 Crystallization enthalpy of amino acid and DMSO aqueous solution with different concentrations

的结晶焓相当;溶液浓度为 3 mol/L 时,只有 L-赖氨酸的结晶焓小于 DMSO 水溶液,其余 3 种氨基酸溶液的结晶焓均大于 DMSO 水溶液;溶液浓度为 4 mol/L 时,L-脯氨酸的结晶焓小于 DMSO 水溶液的结晶焓。上述结果表明,4 种氨基酸在相同溶液浓度下,抑制冰晶能力和 DMSO 相当;且随着 4 种氨基酸水溶液浓度的增大,各自的结晶焓均呈降低趋势,但降幅不同。例如,0.5 mol/L 的 L-赖氨酸的结晶焓为 232.183 J/g,1 mol/L 的 L-赖氨酸的结晶焓为 188.770 J/g,2 mol/L 的 L-赖氨酸的结晶焓为 112.745 J/g,3 mol/L 的 L-赖氨酸的结晶焓为 72.246 J/g,甚至在 4 mol/L 的溶液时,整个降温过程中检测不到明显的结晶。L-赖氨酸和 L-脯氨酸水溶液随着溶质浓度的增大,结晶焓剧烈下降,说明溶液浓度的增大对结晶焓影响很大,溶质的增加使溶液的黏度增大,水分子的自由运动被减弱,在降温过程中抑制冰晶的形成。

图 3 所示为不同浓度氨基酸和 DMSO 水溶液在 10 °C/min 升降温速率下冰点温度的变化。研究发现,各水溶液的冰点温度随溶液浓度的增大均呈下降

趋势,甘氨酸、L-丝氨酸水溶液冰点温度从浓度 0.5 mol/L 到 3 mol/L 的降低过程较为平缓,冰点温度分别降低了 0.63 °C 和 0.39 °C ;L-脯氨酸、L-赖氨酸和 DMSO 水溶液冰点温度随溶液浓度的增大降低较为显著,冰点温度分别降低 25.36、21.70 和 24.65 °C ,说明 L-脯氨酸、L-赖氨酸和 DMSO 的浓度变化对水溶液冰点温度的影响很大,因为溶液浓度增大,氨基酸溶液的官能团与水分子间的作用更加强烈,使水溶液更加难以结晶^[19-20],故水溶液的冰点温度出现大幅降低。

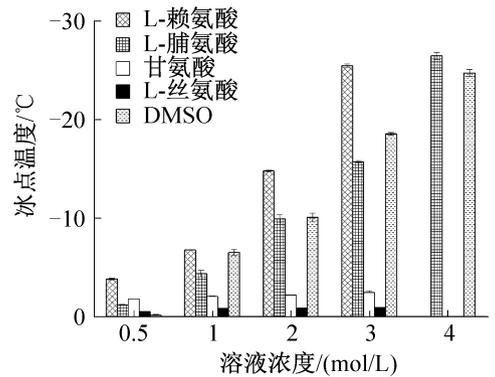


图 3 不同浓度氨基酸和 DMSO 水溶液的冰点温度

Fig.3 Freezing point temperature of amino acid and DMSO aqueous solution with different concentrations

如何抑制降温过程中的冰晶形成和复温过程中的冰晶再生长是低温保存的部分工作,冰晶的生长会对保存的生物材料造成不可逆损伤,大大降低了保存效率。虽然抑制冰晶能力和低温保护效果并非完全一致,但一般低温保护效果好的低温保护剂,抑制冰晶的能力也较强,例如,最常用的低温保护剂 DMSO,其低温保护效果对大部分生物材料都比较好,抑制冰晶的能力也较强,所以在 4 种氨基酸抑制冰晶能力与 DMSO 相当的情况下,还需通过后续的生物试验来验证其低温保护效果。

2.2 氨基酸溶液的水合能力

目前,常用的低温保护剂均具有很强的结合水能力,在寻找新型低温保护剂时,结合水能力是重要考察参数^[21-22]。低温保护剂加入水中,形成未冻水,造成结晶焓和熔融焓降低,主要有两方面原因:一是低温保护剂取代了本该参与相变的纯水的位置,使溶液的浓度增大,黏度增大,不易形成冰晶;二是其中一部分水与低温保护剂相互作用,形成未冻水。利用 DSC 研究低温保护剂的水合性质的方法是通过测量降温过程冻结水分的结晶焓或熔融焓来计算。样品中冻结水的含量可由两种方法获得,从降温冻结过程中测量读取或从升温熔融过程中读取^[23]。由于在溶液浓

度较高时熔程较宽,读取焓值时基线很难确定。因此本文采用降温过程读取焓值的方法。由于在没有预置冰核的情况下降温冻结总是伴随着过冷现象的发生,而在不同温度下水的结晶焓不同,因此在计算结晶焓时,要考虑焓值随温度的变化。分析整理文献[24-25]的相关数据,得出水在不同温度下结晶焓的经验公式:

$$\Delta H(t_f) = -333.88 - 2.05t_f \quad (1)$$

式中: t_f 为成核温度, $^{\circ}\text{C}$ 。

未冻水含量:

$$\mu = \left[1 - \frac{\Delta H(t_f)_{\text{DSC}}}{\Delta H(t_f)} \frac{1}{\omega} \right] \times 100\% \quad (2)$$

式中: μ 为溶液中未冻水的含量; $\Delta H(t_f)_{\text{DSC}}$ 为 DSC 测得溶液在 t_f 下的结晶焓, J/g ; $\Delta H(t_f)$ 为根据式(1)计算得到纯水在 t_f 下的结晶焓, J/g ; ω 为溶液的水分含量。

根据试验数据,结合式(1)、式(2)得出降温过程中 4 种氨基酸低温保护剂水合性质的试验结果,如表 1 所示。

表 1 氨基酸低温保护剂成核温度、结晶焓、水分含量及未冻水含量

Tab.1 Nucleation temperature, crystallization enthalpy, moisture content and unfrozen water content of amino acid cryoprotectants

保护剂	浓度/(mol/L)	$t_f/^{\circ}\text{C}$	$\Delta H(t_f)_{\text{DSC}}/(\text{J/g})$	$\Delta H(t_f)/(\text{J/g})$	ω	μ
L-赖氨酸	0.5	-15.51±0.17	-232.183±1.717	-302.085	0.926±0.005	17.0%
	1	-21.21±0.23	-188.770±2.073	-290.400	0.857±0.003	24.2%
	2	-23.21±0.10	-112.745±2.604	-286.300	0.724±0.004	45.6%
	3	-41.29±0.20	-72.246±0.632	-249.240	0.601±0.002	51.8%
	4	—	—	—	—	—
L-脯氨酸	0.5	-20.69±0.62	-185.035±3.421	-291.466	0.942±0.002	22.6%
	1	-23.34±0.25	-179.079±3.253	-286.033	0.885±0.003	29.3%
	2	-26.07±0.58	-154.627±1.834	-280.437	0.774±0.004	28.8%
	3	-31.29±0.31	-118.371±3.068	-269.736	0.661±0.002	33.6%
	4	-37.96±1.41	-70.847±2.376	-256.062	0.581±0.003	52.4%
甘氨酸	0.5	-20.14±0.07	-203.572±3.537	-292.593	0.937±0.002	25.7%
	1	-20.21±0.14	-196.088±4.526	-292.450	0.925±0.003	27.5%
	2	-22.26±0.59	-184.276±1.032	-288.247	0.870±0.002	26.5%
	3	-25.55±0.13	-172.559±1.685	-281.503	0.825±0.004	25.7%
L-丝氨酸	0.5	-19.33±0.37	-187.452±2.834	-294.254	0.867±0.002	26.5%
	1	-22.32±0.21	-179.653±1.263	-288.124	0.854±0.001	27.0%
	2	-24.57±0.45	-172.281±3.321	-283.512	0.818±0.001	25.5%
	3	-26.06±0.66	-162.305±1.362	-280.457	0.761±0.003	24.1%

由表 1 可知,4 种氨基酸水溶液的成核温度和结晶焓值均随溶液浓度的增大呈降低趋势。L-脯氨酸水溶液浓度从 0.5 mol/L 增至 4 mol/L,未冻水含量大幅增大,因为结合水含量增加,使结晶焓显著降低,该结论与图 2 所得结论一致。对比各浓度下的低温保护剂未冻水含量,发现在低浓度(0.5 mol/L 和 1 mol/L)下,L-赖氨酸的未冻水含量均小于同浓度下

的 L-脯氨酸、甘氨酸及 L-丝氨酸;但在较高浓度(2 mol/L 和 3 mol/L)时,L-赖氨酸水溶液比同浓度其它低温保护剂的未冻水含量更高,说明 L-赖氨酸在较高浓度时,抑制冰晶能力很强,溶液有更大潜力实现玻璃化,只需要降温速率超过其临界降温速率,实现玻璃化的溶液更有利于低温保存生物材料。甘氨酸和 L-丝氨酸的未冻水含量在很小的范围内波动,没

有很明显的增大或下降规律,主要是因为这两种氨基酸与水分子的相互作用很弱,故抑制冰晶能力较差。

2.3 降温速率对溶液冻结过程热物性的影响

根据试验结果发现 4 种浓度的氨基酸水溶液热物性参数随降温速率增大的变化相似,且高浓度溶液的热物性变化较显著,故在研究降温速率对保护剂溶液热物性的影响时,均选择 3 mol/L 溶液进行对比。

图 4 所示为不同降温速率下相同浓度(3 mol/L)的氨基酸水溶液成核温度的变化。随着降温速率的增大各氨基酸溶液的成核温度总体呈下降趋势,但下降幅度较小。降温速率从 5 °C/min 增至 100 °C/min 时,L-赖氨酸、L-脯氨酸、甘氨酸和 L-丝氨酸这 4 种水溶液的成核温度变化分别为 4.24、3.52、2.33、2.93 °C。降温速率增大 20 倍,水溶液的成核温度变化并不显著,说明确定溶液浓度下,降温速率对成核温度的影响较小。

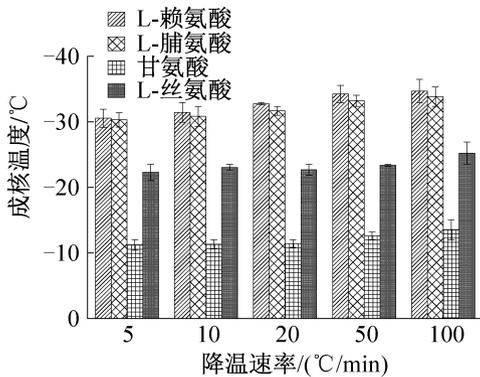


图 4 不同降温速率下氨基酸水溶液的成核温度
Fig.4 Nucleation temperature of amino acid aqueous solution at different cooling rates

图 5 所示为相同浓度(3 mol/L)氨基酸水溶液结晶焓随降温速率的变化。由图 5 可知,4 种氨基酸水溶液的结晶焓随降温速率的增大变化不显著,例如,降温速率从 5 °C/min 增至 100 °C/min,L-赖氨酸水溶液的结晶焓减小了 9.6315 J/g,甘氨酸水溶液的结晶焓减小了 2.6693 J/g,说明降温速率在 100 °C/min 及以下时,4 种氨基酸水溶液的结晶情况无显著变化。但可以发现,L-赖氨酸、L-脯氨酸和 L-丝氨酸水溶液的结晶焓在不断减小,说明随着降温速率的增大,溶液体系中的部分水会“来不及结晶”,水分子间的相互作用力使部分水变为未冻水^[26],宏观表现为溶液体系的结晶焓降低;甘氨酸的结晶焓随降温速率的增大出现波动,没有递增或递减的规律,说明降温速率的变化对甘氨酸与水分子的结合无显著影响,可能因为其较短的分子链无法与水分子产生强的氢键作用。

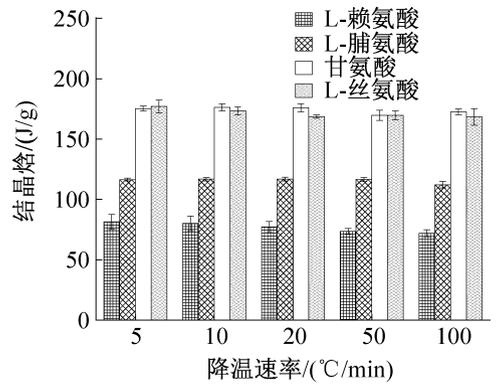


图 5 不同降温速率下氨基酸水溶液的结晶焓
Fig.5 Crystallization enthalpy of amino acid aqueous solution at different cooling rates

图 6 所示为不同降温速率下相同浓度(3 mol/L)的氨基酸水溶液冰点温度的变化。4 种氨基酸水溶液的冰点温度随降温速率的增大变化很小,说明降温速率的增大对氨基酸溶液的冰点温度几乎无影响。L-丝氨酸和甘氨酸水溶液的冰点温度较高约为 -2 °C,L-脯氨酸水溶液的冰点温度约为 -15 °C,L-赖氨酸水溶液的冰点温度约为 -25 °C,这些数据表明在同浓度溶液体系中,L-赖氨酸对水的结晶抑制能力最强,L-脯氨酸次之,甘氨酸和 L-丝氨酸则很弱。

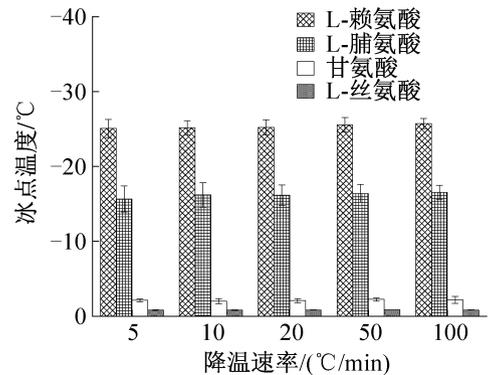


图 6 不同降温速率下氨基酸水溶液的冰点温度
Fig.6 Freezing point temperature of amino acid aqueous solution at different cooling rates

2.4 氨基酸溶液的临界降温速率

在低温保存过程中,若降温速率足够快,则低温保护剂将固化成为玻璃态^[27],从而避免结晶对生物样本造成的结晶损伤。故在确定结晶率的条件下,计算了 4 种氨基酸低温保护剂实现玻璃化转变的临界降温速率,对保存生物样本具有一定的实际意义。

结合文献[28],可以不构造 CCT 曲线,仅利用之前的实验数据,即可得到氨基酸低温保护剂溶液玻璃化转变的临界降温速率:

$$vA(x) = -K_1 \frac{E_a}{R} F(u_0) \quad (3)$$

式中: v 为某次的降温速率, $^{\circ}\text{C}/\text{min}$; K_1 为比例常数, R 为气体常数, $8.314 \text{ J}/(\text{mol} \cdot \text{K})$; E_a 为活化能, J/mol ; $A(x)$ 是结晶率 x 的函数; $F(u_0)$ 是结晶起始温度 t_0 的函数。

通过结晶量与放热量的关系和不同降温速率下异相成核温度变化小等条件^[28]简化式(3)可得:

$$K(t_0) = -vA(x) \quad (4)$$

式中: t_0 为结晶起始温度, $^{\circ}\text{C}$; $K(t_0)$ 为随溶液而不同的常数, $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。

若定义 x_g 为临界结晶率, 则相应的临界降温速率 v_{cr} ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$) 可由式(5)求得:

$$v_{cr} = -\frac{K(t_0)}{A(x_g)} \quad (5)$$

3 mol/L 的 L-脯氨酸的 DSC 测量数据如表 2 所示。表中取 $30 \text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 时的 q 为 q_{\max} , 求得 x_i , 得到系列的 $K_i(t_0)$ 值, 最后可得 $K_i(t_0) = (-286.28 \pm 8.83) \text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。

对于某一种溶液, $K(t_0)$ 为仅取决于结晶起始温度 t_0 的函数, 对于 3 mol/L 的 L-脯氨酸溶液, $t_0 =$

$(-32.38 \pm 2.00) \text{ }^{\circ}\text{C}$, 将其视为常数是合理的。

表 2 3 mol/L L-脯氨酸的 DSC 测量数据

Tab.2 The DSC measurement data of 3 mol/L L-proline

i	$v_i/$ ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	$q_i/$ (J/g)	x_i	$A_i(x)$	$K_i(t_0)/$ ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)
1	30	116.785 8	1	∞	∞
2	50	116.527 9	0.997 792	5.770 5	-288.53
3	100	112.237 3	0.961 053	2.937 6	-293.76
4	200	39.054 4	0.334 411	1.382 7	-276.54

对其它氨基酸保护剂水溶液数据进行相同的处理, $K(t_0)$ 的测定结果如表 3 所示。

v_{cr} 的计算值如表 4 所示, 由于 2 mol/L 的甘氨酸和 L-丝氨酸结晶焓不满足计算要求, 故无法通过试验数据计算其临界降温速率; 4 mol/L 的 L-赖氨酸溶液实现玻璃化, 故无数据; 甘氨酸和 L-丝氨酸 4 mol/L 溶液溶质无法完全溶解, 故无数据。根据文献^[28]取 $x_g = 0.05$ 时, 在降温过程中 DSC 记录的曲线检测不到明显的结晶峰, 故取 $x_g = 0.05$ 计算临界降温速率较为合理。

表 3 不同浓度低温保护剂的 $K(t_0)$ 值

Tab.3 The $K(t_0)$ values of different concentrations of cryoprotectants

溶液浓度/(mol/L)	L-赖氨酸	L-脯氨酸	甘氨酸	L-丝氨酸
2	-563.95±8.19	-405.1±12.89	—	—
3	-351.9±10.81	-286.28±8.83	-415.58±8.03	-360.4±23.18
4	—	-186.07±9.16	—	—

表 4 v_{cr} 的计算值

Tab.4 The calculated value of v_{cr}

溶液浓度/ (mol/L)	L-赖氨酸	L-脯氨酸	甘氨酸	L-丝氨酸
2	511	373	—	—
3	324	264	378	343
4	—	174	—	—

从计算结果来看, 氨基酸类保护剂溶液浓度增大后, 其临界降温速率减小, 因为溶液浓度增大, 使溶液更加黏稠, 更容易实现玻璃化。

2.5 氨基酸类低温保护剂影响溶液结晶的机理探讨

低温保护剂对冰晶的抑制作用, 归根结底是溶液官能团与水分子之间的相互作用。氨基酸分子是一

种两性电解质, 大部分氨基酸在水溶液中或晶体状态时都以离子形式存在, 氨基酸类保护剂的官能团是氨基 ($-\text{NH}_2$) 和羧基 ($-\text{COOH}$), 在分子中同时具有酸性和碱性官能团, 具有很强的亲水性, 氨基和羧基在降温过程中与水分子相互作用结合形成氢键, 增加了溶液的黏性, 从而使水溶液中受扩散制约的结晶过程变得缓慢, 减弱冰晶的生长, 使溶液的热物性发生变化, 成核温度和溶液冰点温度降低, 溶液结晶焓减小。

G. M. Fahy 等^[29]认为保护剂的官能团除了会与水分子键合, 自身官能团也会键合。N. J. Chen 等^[30]研究表明氨基酸分子链结构差异对其与水分子结合能力有显著影响。图 7 所示为 4 种氨基酸的分子结构式。由图 7 可以看出, 在相同浓度的溶液中, L-脯氨酸、甘氨酸和 L-丝氨酸的氨基和羧基浓度相同, L-赖氨酸的氨基浓度比这 3 种氨基酸要大, 且分子链长, 保

护剂官能团自身键合概率小,故在较高浓度(2 mol/L 和 3 mol/L)的条件下,L-赖氨酸的成核温度、冰点温度和结晶焓显著小于其他 3 种氨基酸,因为 L-赖氨酸的结合水能力更强,未冻水含量的结果很好的验证了该结论。虽然 L-脯氨酸、甘氨酸和 L-丝氨酸的氨基和羧基浓度相同,但分子结构差异很大,L-脯氨酸的分子链为环状,该结构大大减小了保护剂自身氨基和羧基键合的概率,其官能团与水分子的键合概率增大,显著改变了其水溶液的热物性。甘氨酸和 L-丝氨酸的分子结构相似,这两种氨基酸分子链较短,使保护剂自身氨基和羧基键合概率增大,与水分子键合的官能团减少,故其水溶液热物性的变化较小。

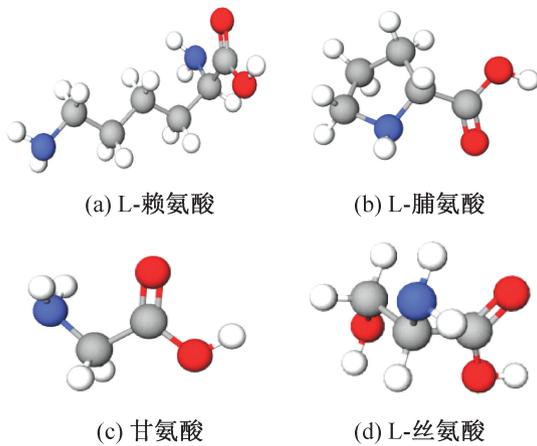


图 7 4 种氨基酸的分子结构式

Fig.7 The molecular structure formula of four amino acids

3 结论

本文以 L-赖氨酸、L-脯氨酸、甘氨酸及 L-丝氨酸为研究对象,通过差示扫描量热法研究了降温速率和溶液浓度对 4 种氨基酸水溶液的影响,并基于升降温过程得到的热物性参数进行分析,得出如下结论:

1) 随溶液浓度或降温速率的增大,4 种氨基酸水溶液的成核温度、结晶焓和冰点温度均会降低。

2) 通过修正的 Boutron 结晶动力学半经验公式得到 2 mol/L 的 L-赖氨酸水溶液临界降温速率为 511 °C/min,3 mol/L 的 L-赖氨酸水溶液临界降温速率为 324 °C/min,其它氨基酸水溶液临界降温速率如表 4 所示。该结果可为后续氨基酸类保护剂玻璃化保存提供参考。

3) 通过计算发现 L-赖氨酸和 L-脯氨酸的未冻水含量随溶液浓度的增大而显著增大,L-赖氨酸的未冻水含量从 17% 增至 52%,L-脯氨酸的未冻水含量从 22% 增至 52%,甘氨酸和 L-丝氨酸的未冻水含量均在 27% 左右波动,该结果表明 L-赖氨酸和 L-脯

氨酸的抑制冰晶能力较强。

4) 通过试验获得了一些基础的冻结特性数据,对进一步研究氨基酸类低温保护剂在细胞内外运输的温度响应机制、定量研究 4 种氨基酸的结晶过程以及优化细胞冷冻方案提供了重要依据,但对具体细胞低温冻存保护的效果和机理需进一步研究。

参考文献

- [1] BROCKBANK K G, SONGY C. Morphological analyses of ice-free and frozen cryopreserved heart valve explants [J]. *Journal of Heart Valve Disease*, 2004, 13(2):297-301.
- [2] TAYLOR M J, SONG Y C, BROCKBANK K G. Vitrification in tissue preservation: new developments [M]. Boca Raton: CRC Press, 2004.
- [3] AITA K, IRIE H, TANUMA Y, et al. Apoptosis in murine lymphoid organs following intraperitoneal administration of dimethyl sulfoxide (DMSO) [J]. *Experimental and Molecular Pathology*, 2005, 79(3):265-271.
- [4] WINDRUM P, MORRIS T C M, DRAKE M B, et al. Variation in dimethyl sulfoxide use in stem cell transplantation: a survey of EBMT centres [J]. *Bone Marrow Transplantation*, 2005, 36(7):601-603.
- [5] SHU Z, HEIMFELD S, GAO D. Hematopoietic SCT with cryopreserved grafts: adverse reactions after transplantation and cryoprotectant removal before infusion [J]. *Bone Marrow Transplantation*, 2014, 49(4):469-476.
- [6] KONUMA T, OOI J, TAKAHASHI S, et al. Cardiovascular toxicity of cryopreserved cord blood cell infusion [J]. *Bone Marrow Transplantation*, 2008, 41(10):861-865.
- [7] 雷晓华, 曹宇静, 段恩奎, 等. 四种冷冻保护剂对小鼠 2-细胞胚胎渗透性和毒性作用的比较 [J]. *动物学报*, 2008, 54(4):725-732. (LEI Xiaohua, CAO Yujing, DU-AN Enkui, et al. Comparison of permeability and toxicity of four cryoprotectants on mouse 2-cell embryos [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2008, 54(4):725-732.)
- [8] ARMITAGE W J, MAZUR P. Toxic and osmotic effects of glycerol on human granulocytes [J]. *American Journal of Physiology-cell Physiology*, 1984, 247(5):382-389.
- [9] WANG Tingchuang, ZHU Qingyan, YANG Xiaoping, et al. Antifreeze glycoproteins from antarctic notothenioid fishes fail to protect the rat cardiac explant during hypothermic and freezing preservation [J]. *Cryobiology*, 1994, 31(2):185-192.
- [10] KOSHIMOTO C, MAZUR P. Effects of warming rate, temperature, and antifreeze proteins on the survival of mouse spermatozoa frozen at an optimal rate [J]. *Cryobiology*, 2002, 45(1):49-59.
- [11] LIU Suhuai, WANG Wenjun, ELISABETH V M, et al. In vitro studies of antifreeze glycoprotein (AFGP) and a c-

- linked AFGP analogue [J]. *Biomacromolecules*, 2007, 8(5):1456-1462.
- [12] EROGLU A, RUSSO M J, BIEGANSKI R, et al. Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(2):163-167.
- [13] EROGLU A, TONER M, TOTH T L. Beneficial effect of microinjected trehalose on the cryosurvival of human oocytes [J]. *Fertility and Sterility*, 2002, 77(1):152-158.
- [14] ZHANG Lu, XUE Xu, YAN Jie, et al. L-proline: a highly effective cryoprotectant for mouse oocyte vitrification [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1):26326.
- [15] CAO Xinyan, ROSE J, WANG Shiyong, et al. Glycine increases preimplantation development of mouse oocytes following vitrification at the germinal vesicle stage [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1):37262.
- [16] 高才, 周国燕, 胥义, 等. 乙二醇和丙三醇水溶液冻结特性的研究 [J]. *物理化学学报*, 2004, 20(2):123-128. (GAO Cai, ZHOU Guoyan, XU Yi, et al. Study on freezing characteristics of glycol and glycerol aqueous solution [J]. *Acta Physico-Chimica Sinica*, 2004, 20(2):123-128.)
- [17] 华泽钊. 低温生物医学技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1994. (HUA Zezhao. *Cryobiomedical technology* [M]. Beijing: Science Press, 1994.)
- [18] HALLETTJ H. Experimental studies of the crystallization of supercooled water [J]. *Journal of the Atmospheric Sciences*, 1964, 21(6):671-682.
- [19] GONDA T, SEI T. 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(1-3):70-80.
- [20] MANDUMPAL J B, KRECK C A, MANCERA R L. A molecular mechanism of solvent cryoprotection in aqueous DMSO solutions [J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2011, 13(9):3839-3842.
- [21] FURUKI T. Effect of molecular structure on thermodynamic properties of carbohydrates. A calorimetric study of aqueous di- and oligosaccharides at subzero temperatures [J]. *Carbohydrate Research*, 2002, 337(5):441-450.
- [22] HITMI A, COUDRET A, BARTHOMIEUF C, et al. Role of intracellular water retention strength in freezing tolerance of *chrysanthemum cinerariaefolium* vis. cell cultures [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2000, 157(1):47-53.
- [23] 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. DSC study on the hydration and vitrification of protectant solution [J]. *Journal of University of Shanghai for Science and Technology*, 2005, 27(5):381-384.)
- [24] JABRANES, LÉTOFFÉ J M, CLAUDY P. Vitrification and crystallization in the R(-)1,2-propanediol-S(+)-1,2-propanediol system [J]. *Thermochimica Acta*, 1995, 258(7):33-47.
- [25] 胥义, 周国燕, 胡桐记, 等. 用 DSC 测定兔主动脉血管冻结相变区间的表观比热容及其影响因素 [J]. *制冷学报*, 2005, 26(1):38-43. (XU Yi, ZHOU Guoyan, HU Tongji, et al. Determination of apparent specific heat capacity and its influencing factors in freezing phase transition region of rabbit aorta by DSC [J]. *Journal of Refrigeration*, 2005, 26(1):38-43.)
- [26] PANDIT S A, BOSTICK D, BERKOWITZ M L. Molecular dynamics simulation of a dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer with NaCl [J]. *Biophys Journal*, 2003, 84(6):3743-3750.
- [27] FRANKS F. *Water and aqueous solutions at subzero temperatures* [M]. New York: Springer US, 1982.
- [28] 董铁锋, 程曙霞, 高大勇. 渗透性低温保护剂玻璃化转变临界降温速率的实验确定 [J]. *低温工程*, 2003(2):47-53. (DONG Yifeng, CHENG Shuxia, GAO Dayong. Experimental determination of critical cooling rate of vitrification transition of permeable cryoprotectants [J]. *Cryogenics*, 2003(2):47-53.)
- [29] 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.
- [30] CHEN N J, MORIKAWA J, HASHIMOTO T. Effect of amino acids on the eutectic behavior of NaCl solutions studied by DSC [J]. *Cryobiology*, 2005, 50(3):264-272.

通信作者简介

胥义, 男, 教授, 上海理工大学, 13917434302, E-mail: xuyi@usst.edu.cn. 研究方向: 低温生物医学技术(大型器官低温保存、生物制品冷冻干燥)。

About the corresponding author

Xu Yi, male, Ph. D., professor, Institute of Biothermal Science and Technology, University of Shanghai for Science and Technology, +86 13917434302, E-mail: xuyi@usst.edu.cn. Research fields: cryobiomedical technology (cryopreservation of large organs, freeze-drying of biological products).