

[Note]

www.whxb.pku.edu.cn

醇类低温保护剂对 NaCl 水溶液共晶的影响

周国燕* 胡桐记 高才 华泽钊

(上海理工大学低温医学与食品冷冻研究所, 上海 200093)

摘要 为了研究低温保护剂对盐水溶液共晶的影响, 利用差示扫描量热法(DSC)对添加不同浓度的甘油、乙二醇、1, 2-丙二醇、1, 3-丙二醇和二甲基亚砜的 NaCl 水溶液的共晶现象进行了研究. 发现 NaCl 水溶液共晶是一个过冷随机过程, 醇类和二甲基亚砜对之有抑制作用. 保护剂浓度越高, 共晶焓越小, 对共晶的抑制作用越大. 其中 4 种醇类保护剂的抑制能力从强到弱依次是甘油、乙二醇、1, 2-丙二醇和 1, 3-丙二醇. 其抑制能力的强弱主要由分子量/羟基数的比值决定, 其次受甲基影响. 二甲基亚砜抑制共晶的能力与乙二醇的接近. 研究发现升温过程中, 三元溶液发生共晶体的玻璃化现象和反玻璃化现象.

关键词: 醇类低温保护剂, 差示扫描量热法, 共晶, NaCl, 二甲基亚砜

中图分类号: O645, O642

The Influence of Alcohol Cryoprotectants on Eutectic Crystallization of NaCl Aqueous Solutions Studied by DSC

ZHOU, Guo-Yan* HU, Tong-Ji GAO, Cai HUA, Ze-Zhao

(Institute of Cryomedicine and Food Refrigeration, Shanghai University of Science and Technology, Shanghai 200093, P. R. China)

Abstract In order to investigate the effect of cryoprotective agent (CPA) on the eutectic crystallization of salt solution, differential scanning calorimetry (DSC) is used to study the eutectic phenomena of NaCl aqueous solutions with different concentrations of glycerol, ethylene glycol, 1,2-propylene glycol, 1,3-propylene glycol, and dimethyl sulfoxide. It is found that the eutectic crystallization is a super-cooling and random process. Cryoprotective agent can restrain the eutectic crystallization of NaCl aqueous solutions. The higher the concentration of cryoprotective agents, the less the enthalpy of eutectic crystallization and the bigger the capability of restraining the eutectic crystallization. The restraining effects of cryoprotective agents on eutectic crystallization are different. The best is glycerol and then is ethylene glycol, 1,2-propylene glycol, and 1,3-propylene glycol, respectively. The restraining capability of alcohols is largely determined by the ratio of molecular weight to number of hydroxyl group, and affected by the number of methyl group as well. The capability of dimethyl sulfoxide to restrain the eutectic phenomena of NaCl aqueous solutions is similar to that of ethylene glycol. It is also found that the glass transition and devitrification phenomena take place during the heating process.

Keywords: Alcohol cryoprotective agent, Differential scanning calorimetry, Eutectic crystallization, NaCl, Dimethyl sulfoxide

低温在生物医学中主要应用于低温保存和低温冷冻, 所使用的低温既可以作为保存的手段也可以

是破坏生物体(细胞和组织)的方法. 虽然这些应用的目的是相反的, 但是都涉及到细胞以及组织冻结

Received: September 28, 2005; Revised: January 6, 2006. *Correspondent, Email: efly_snow@163.com; Tel / Fax: 021-65686049.

国家自然科学基金(50206013)和上海市重点学科建设项目(T0503)资助

©Editorial office of Acta Physico-Chimica Sinica

损伤的机理. 在研究细胞的冻结损伤方面,除了通常的冰晶引起的细胞损伤外,还有细胞内外溶液引起的共晶损伤. 共晶是指溶液中未冻结的部分(水和溶质)同时固化成固体(水合物)^[1]. Kristiansen^[2]研究发现盐溶液中的脂质体冻结时,共晶的出现使脂质体损伤程度明显增加. Greaves^[3]使用 DTA 研究水溶液和血浆的相变时,观察到共晶的形成. 共晶对细胞的损伤可能有两个原因. 第一,共晶产生后对细胞膜的机械损伤. 当细胞外溶液结晶时,细胞膜暴露在未冻溶液中,周围包围着较大的冰晶,这些冰晶不一定对细胞膜产生破坏. 而相对于尺寸较大的冰晶,共晶产生在细胞外冰晶和细胞膜之间的空隙内,具有尺寸小、尖利、粗糙等特性^[3],更能引起细胞膜的机械损伤. 第二,细胞内共晶损伤. 它与胞内冰晶损伤类似,给细胞带来直接损伤.

在低温保存中,一般加入低温保护剂(CPA)来减少或避免低温损伤. Meryman^[4]在研究水溶液相变的特性时发现甘油和 DMSO 都能够防止共晶的形成. Cocks 等^[5]在研究三元体系玻璃态的稳定性时,发现甘油有防止 NaCl 溶液共晶形成的能力. Nicolajsen 等^[6]在研究三元体系状态图时,发现海藻糖可以抑制 NaCl 溶液共晶. Izutsu 等^[7]在文章中提到在向 NaCl 水溶液中加入糖和聚合物后,溶液的共晶将受到抑制. Han 等^[8]观察到加入牛血清蛋白后共晶消失.

上述研究都表明在盐溶液中加入 CPA 后,共晶现象可以被抑制,但对于共晶被抑制的程度和 CPA 种类及浓度的关系没有进一步研究. 本文利用 DSC (差示扫描量热)试验,研究加入常用醇类 CPA 的 NaCl 水溶液的共晶,分析醇的种类和浓度对这一类似生理溶液共晶的影响,同时研究 DMSO(二甲亚砜)的抑制效果,并与醇的比较.

1 实验方法与材料

1.1 试剂

乙二醇、甘油和 NaCl(威尔昆化学试剂有限公司)、1,2-丙二醇、1,3-丙二醇和 DMSO(国药集团化学试剂有限公司)均为国产分析纯试剂. 溶液配制和仪器标定用水为二次蒸馏水. 标定用环戊烷为色谱标准试剂(上海生化试剂有限公司).

1.2 差示扫描量热仪

差示扫描量热仪为 DSC-Pyris Diamond(美国 Perkin-Elmer 公司). 温度标定采用环戊烷降温过程中的 $-135.06\text{ }^{\circ}\text{C}$ 相转变以及二次蒸馏水的熔融(均采

用外推起始温度)进行两点标定;热焓标定采用二次蒸馏水的熔融焓($334\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$)标定^[9,10]. 标定速率为 $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. 液氮冷却采用 Cryofill™, Perkin-Elmer 公司的液氮容器控制. 样品冲洗气体为高纯度氦气(纯度 $>99.999\%$),流量 $30\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 保持不变. 样品皿为标准液体铝皿(美国 Perkin-Elmer 公司),样品量为 $10\sim 20\text{ mg}$,精确到 $\pm 0.01\text{ mg}$. 天平采用赛多利斯的 BP211D,精确到 0.01 mg . 实验的升、降温速率为 $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

1.3 实验方法

在温区方面重点考察,因为低温损伤主要出现在低温保存“两步法”^[11]中的第一阶段的降温过程,因此将实验温区定在 $0\sim -70\text{ }^{\circ}\text{C}$. 实验中 NaCl 溶液浓度分别以 5%、10%、15% 配制,再以此为母液配制不同浓度的 CPA 溶液. CPA 溶液的配制方法是:从不含 CPA 到 CPA 的浓度逐渐增大,直到降温过程中没有共晶现象出现为止. 不同浓度区间,CPA 浓度增加的梯度是不同的. 小浓度区间($0\sim 3\%$)取 0.5% 的梯度;大浓度区间($3\sim 9\%$)取 2% 的梯度增加. 所有溶液均以质量分数(%)配制. 每个样品作三个平行样,实验结果取其平均值.

1.4 数据分析

转变温度与转变焓的读取采用热分析软件 Pyris Software(美国 Perkin-Elmer 公司, 5.0 版本). 在相变前后比热变化不大时,用标准基线;变化较大时使用“S”形基线. 玻璃化转变温度取比热变化一半处的温度,即半比热温度(half C_p , HC). 冻结温度和共晶温度取台阶上升沿斜率最大点和基线交点对应的温度,即外推起始温度(onset). 熔融温度和反玻璃化转变温度分别取熔融峰顶点温度和反玻璃化峰的顶点温度^[12].

2 结果与讨论

2.1 共晶温度和共晶熔融温度

实验得到以 5%、10%、15% NaCl 水溶液为母液的含不同浓度五种 CPA 溶液热流曲线图. 图 1 是 15% NaCl+1% 甘油水溶液的热流曲线图. 由图可见,随试样温度的降低,首先出现水的冻结(点 A),然后出现共晶(点 B). 复温时首先出现共晶熔融(点 C),尔后是冰晶熔融(点 D). 从图中可获得共晶温度(T_{cut})、共晶熔融温度($T_{\text{cut-mel}}$)、共晶焓(H_{cut})和共晶熔融焓($H_{\text{cut-mel}}$). 表 1 给出了甘油的相关温度数据. 从表中可看出,不含 CPA 情况下,相对于平衡热力学共晶温度(NaCl 溶

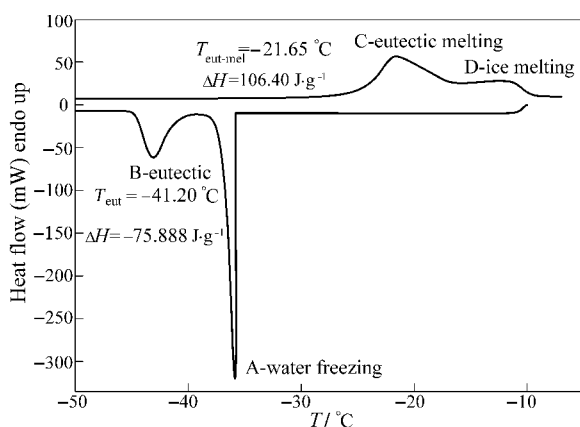


图1 15% NaCl+1%甘油水溶液热流曲线图

Fig.1 DSC cooling and warming thermograms of 15% NaCl+1% glycerol aqueous solution

液的是 $-21.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ^[4], NaCl 溶液共晶是过冷到一定的温度以后发生的. NaCl 浓度提高, 共晶温度升高. 这与溶液浓度提高, 水结晶温度升高的规律相同. 而共晶熔融温度几乎不变, 与平衡热力学共晶温度接近.

当 NaCl 浓度确定后, 随着甘油加入浓度的增大, 共晶温度和共晶熔融温度总的趋势是降低, 其中有个别温度点反常. CPA 加入后, 共晶温度降低是因为醇与水之间形成氢键, 并与水一起充当了 NaCl

表1 甘油溶液的共晶温度和共晶熔融温度

Table 1 Eutectic temperature and eutectic melting temperature of glycerol aqueous solutions

$w(\text{NaCl})(\%)$	$w(\text{glycerol})(\%)$	$T_{\text{eut}}/^{\circ}\text{C}$	$T_{\text{eut-mel}}/^{\circ}\text{C}$
5	0.0	-40.45	-20.98
	0.5	-42.75	-21.84
	1.0	-41.23	-22.43
	1.5	-45.45	-23.84
	3.0		-26.16
	5.0		-28.58
10	0.0	-39.16	-21.48
	0.5	-38.42	-21.63
	1.0	-39.34	-21.71
	1.5	-42.62	-22.15
	3.0	-44.85	-22.99
	5.0		-24.45
15	0.0	-38.71	-21.31
	1.0	-41.19	-21.68
	1.5	-41.86	-21.65
	3.0	-41.40	-22.32
	5.0	-44.87	-22.83
	7.0		-24.69

的溶剂, 相当于稀释了 NaCl 浓度, 从而使共晶温度下降. 其中反常情况主要表明共晶是一种随机现象. 而 CPA 加入后共晶熔融温度降低, 说明加入的醇改变了形成的共晶体的结构或成分, 共晶体中部分水被 CPA 分子替代. 因为如果共晶体的结构或成分都没有改变, 生成的共晶体应该还是 $\text{NaCl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{ice}$, 那么共晶熔融温度应该与 $\text{NaCl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{ice}$ 的平衡热力学共晶温度($-21.8\text{ }^{\circ}\text{C}$)相同. 具体的共晶体的组成还有待于确定.

实验发现4种醇和DMSO的共晶温度总是出现在 $-38.7\sim -47.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温度区间内, 共晶熔融温度总出现在 $-20.1\sim -24.6\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温度区间内. 这是由电解质(NaCl)的种类决定的. Chen 等^[13]在研究氨基酸对 NaCl 和 KCl 水溶液的影响时, 发现两种电解质溶液的共晶温度和熔融温度分别有很大的区别.

实验还发现加入 CPA 后, 共晶依然是过冷到一定温度出现的. 这已经有一些文献提到^[3, 14]. 有研究发现用过冷棒来给溶液置晶(seeding), 也能引起共晶^[15]. 在平衡热力学共晶温度和共晶温度之间保持样品 15 min 以上, 也能使样品发生共晶现象^[14]. 这些都说明共晶现象和水的结晶现象类似, 是一个过冷的、随机的过程. 在共晶熔融温度实验数据中, 有些数值变化不明显, 或者有反常的情况, 这主要由于 CPA 浓度变化小, 本身温度值变化就小; 另外读取实验值取点不同可能会带来 $\pm 0.05\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的误差造成的.

2.2 共晶熔

实验发现, 加入 CPA 后共晶峰和共晶熔融峰变小, CPA 浓度越大, 共晶峰和共晶熔融峰越小, 当 CPA 增加到一定浓度时, 共晶峰消失. 说明 CPA 有抑制 NaCl 水溶液共晶的作用. CPA 对 NaCl 溶液共晶的抑制程度, 可以通过 DSC 实验中共晶熔和共晶熔融熔的变化来判断. 图 2 以乙二醇为例, 给出了不同 NaCl 浓度情况下, 乙二醇浓度与共晶熔的关系. 从图中可看出, 对于同浓度 NaCl 溶液, 加入乙二醇后, 其溶液共晶熔变小. 乙二醇浓度越大, 共晶熔越小. 其他醇和 DMSO 有同样的规律. 这说明 CPA 浓度越大, 对溶液共晶的抑制作用越显著. 而 NaCl 浓度越大, 要完全抑制共晶, 需要的 CPA 浓度越大, 因为 NaCl 浓度大, 每单位溶液所含溶质(NaCl)的份额也大.

图 3 给出了 15%NaCl 浓度下, 4 种醇类 CPA 浓度与共晶熔的关系. 从中可看出 4 种醇抑制 NaCl 水溶液共晶的能力是不同的, 从强到弱依次是甘油、

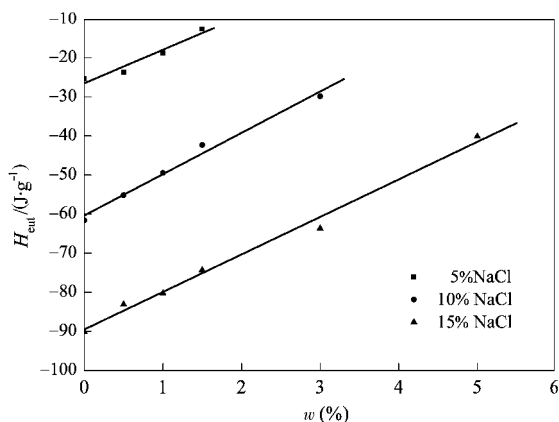


图2 不同 NaCl 浓度下, 乙二醇水溶液的共晶焓与乙二醇浓度关系

Fig.2 Ethylene glycol concentration dependence of eutectic enthalpy of ethylene glycol aqueous solutions under different NaCl concentrations

乙二醇、1, 2-丙二醇和 1, 3-丙二醇. 不同的 NaCl 浓度情况下都有同样的规律. 这可能与醇类物质的分子量, 含有羟基的数目和位置等参数有关. 虽然醇类 CPA 对 NaCl 水溶液共晶抑制的具体原因还不是非常清楚, 但它很有可能是因为 CPA 与水作用形成氢键, 使未冻液的粘度升高, 把盐“诱捕”到高粘度甚至是类似玻璃的相中, 使盐不能运动形成共晶体. 或者是因为 CPA 改变了水和 NaCl 之间的相互作用^[6], 并替代了共晶体中的部分水分子. 表 2 给出了醇类 CPA 的相关参数. 从表中可以看出, 甘油的分子量/羟基数的比值最小, 其次是乙二醇, 1, 2-丙二醇和 1, 3-丙二醇的大一些. 说明在质量分数配比相同的情况下, 加入甘油的 NaCl 水溶液中, 含有的羟基数

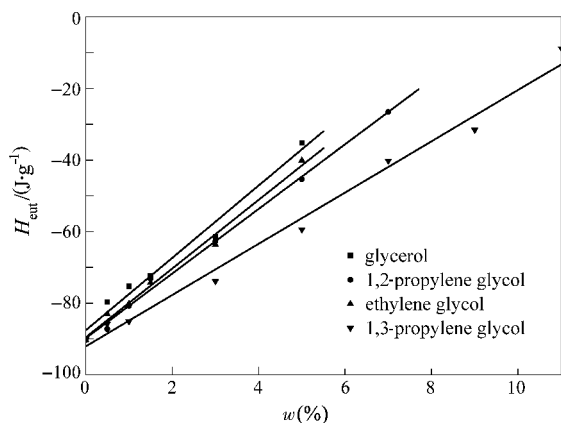


图3 含 15%NaCl 三元溶液共晶焓与醇类 CPA 浓度的关系

Fig.3 The eutectic enthalpy change with concentration of CPA of ternary aqueous solutions

CPA: cryoprotective agent

表 2 四种醇类低温保护剂的参数比较

Table 2 Parameters of alcohol CPA

	Glycerol	Ethylene glycol	1,2-propylene glycol	1,3-propylene glycol
$M/(\text{g}\cdot\text{mol}^{-1})$	92.09	62.07	76.10	76.10
N	3	2	2	2
$M/N(\text{g}\cdot\text{mol}^{-1})$	30.70	31.04	38.05	38.05

M: molecular mass, N: number of hydroxyl group

目最多, 这表示该溶液中, 甘油与水作用形成的氢键最多, 则抑制效果最好. 其他依次是乙二醇、1, 2-丙二醇和 1, 3-丙二醇.

对于 1, 2-丙二醇和 1, 3-丙二醇, 分子量/羟基数的值相同, 但羟基的位置不同, 1, 2-丙二醇中有一个甲基. 这个自由甲基可以改变水分子的排列结构, 而这种结构被认为与冰的结构有很大不同, 即文献 [17-18] 提到的“non-ice-like structure”. 有些人^[9]认为孤立甲基的参与改变了水分子之间的原有结构, 增加了水分子之间的相互作用力. 这样在结晶过程中, 不仅可迁移到结晶界面的水分子数量大大减少, 而且迁移速度也大大减慢. 还有一种解释是, 甲基的存在降低了低温保护剂自身的相互作用, 这样就大大增加了低温保护剂与水分子之间的键合机会. 高才^[20]研究发现 1, 2-丙二醇水溶液的结合水含量比 1, 3-丙二醇的高. 这些都说明甲基的存在增强了 1, 2-丙二醇抑制共晶的效果. 可见醇类 CPA 抑制 NaCl 水溶液共晶的能力主要由分子量/羟基数的比值决定, 其次受甲基的影响.

图 4 给出了 DMSO 抑制 NaCl 水溶液共晶的效果, 从中可以看出, DMSO 抑制 NaCl 水溶液共晶的

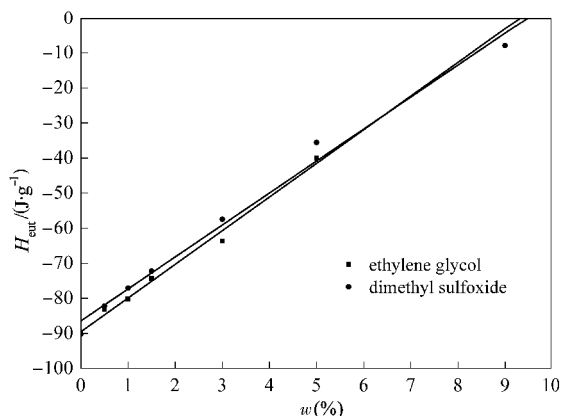


图 4 含 15% NaCl 三元溶液共晶焓与乙二醇和 DMSO 浓度的关系

Fig.4 The eutectic enthalpy change with concentration of DMSO and ethylene glycol of ternary aqueous solutions with 15% NaCl

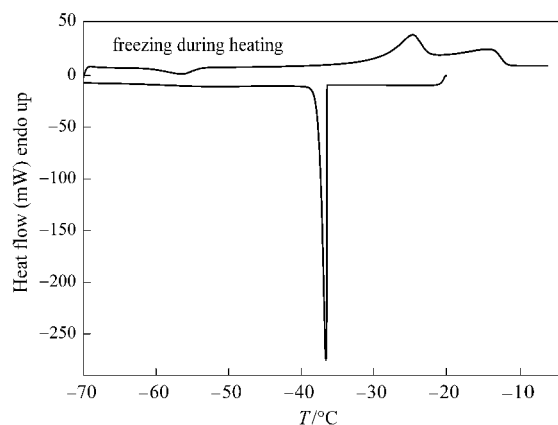


图5 15% NaCl+7%甘油水溶液的热流曲线图

Fig.5 DSC cooling and warming thermograms of 15% NaCl+7% glycerol aqueous solution

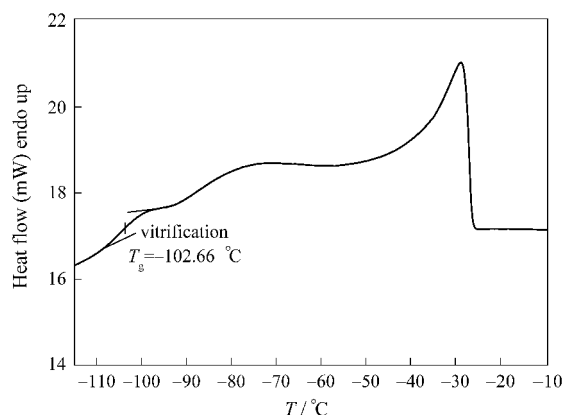


图6 25% DMSO、5%NaCl 和 70%水的溶液的升温热流曲线图

Fig.6 DSC warming thermogram of aqueous solution containing 25% DMSO and 5% NaCl

能力与乙二醇的接近. 主要是 DMSO 中有很强的分子极性和甲基的作用.

2.3 溶液升温结晶现象

对于 CPA 含量较高的 NaCl 溶液, 当降温过程中不再出现共晶时, 升温时溶液还是有两个熔融峰出现. 经热流曲线(图 5)分析发现, 共晶出现在升温过程中. 共晶和水结晶相似, 是一个动力学固化过程. 基于经典成核结晶理论, 一个固化过程包括成核和晶体生长. 成核与晶体生长不仅可以在降温过程中发生, 而且在升温过程中也能发生 (反玻璃化). 从图 5 中可以看出, 无论升温中结晶峰出现的温区、峰型、焓值都与反玻璃化很相似. 它应该是共晶体的

表 3 升温产生共晶体的反玻璃化相关数据

Table 3 The data of devitrification phenomena taking place during the heating processes

Solution	Devitrification temperature(°C)
5%NaCl+3% ethylene glycol	-51.1
10%NaCl+5% ethylene glycol	-56.3
15%NaCl+7% ethylene glycol	-62.5
10%NaCl+5% 1,2-propylene glycol	-67.4
15%NaCl+5% 1,2-propylene glycol	-39.1
15%NaCl+7% 1,2-propylene glycol	-66.1
10%NaCl+5% glycerol	-54.6
15%NaCl+5% glycerol	-49.1
15%NaCl+7% glycerol	-56.4
10%NaCl+7% 1,3-propylene glycol	-61.6
15%NaCl+7% 1,3-propylene glycol	-70.9
15%NaCl+9% 1,3-propylene glycol	-68.9
10%NaCl+5% DMSO	-55.7
10%NaCl+7% DMSO	-50.1
15%NaCl+7% DMSO	-61.3

反玻璃化现象, 而不是水的反玻璃化现象. 表 3 列出了升温产生共晶体的反玻璃化相关数据.

2.4 溶液玻璃化现象

Cock 等^[21]在研究 DMSO、NaCl 和水的三元溶液系统时, 认为由于 DMSO 抑制作用, 溶液的共晶熔融峰会推迟到-100 °C左右出现. 但是通过我们的实验证实, 文献[21]所认为的-100 °C左右出现共晶熔融峰, 其实是溶液的玻璃化现象. 如图 6 所示, 实验中测得含 25% DMSO、5% NaCl 和 70%水的三元溶液玻璃化转变温度是-102.66 °C.

3 结论

用差示扫描量热仪研究了四种醇类低温保护剂对 NaCl 水溶液的共晶现象的影响. 三元溶液共晶是过冷到一定温度以后发生的, 温度变化范围大. 共晶熔融温度与平衡热力学共晶温度非常接近, 温度变化范围小. 醇类低温保护剂和 DMSO 有抑制 NaCl 水溶液共晶的作用. 保护剂浓度越高, 共晶焓越小, 对共晶的抑制作用越大. 4 种醇抑制 NaCl 水溶液共晶的能力从强到弱依次是甘油、乙二醇、1, 2-丙二醇和 1, 3-丙二醇, 主要由分子量/羟基数的比值决定, 其次受甲基的影响. DMSO 抑制 NaCl 水溶液共晶的能力与乙二醇的接近. 升温过程中, 溶液发生共晶体的反玻璃化现象和玻璃化现象.

References

- Shackelford, J. F. Introduction to materials science for engineers. 6th ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2004: 304-335

- 2 Kristiansen, J. *Cryobiology*, **1992**, **29**: 575
- 3 Greaves, R. I. N. Preservation of antigens and antibodies. In: Stowell, R. E. ed. *Cryobiology: A Conference Sponsored by American Cancer Society*, New York, 1965: S253-S258
- 4 Meryman, H. T. *Cryobiology*. New York: Academic Press, 1966: 1-144
- 5 Cocks, E. H.; Hildebrand, W. H. *J. Appl. Phys.*, **1975**, **46**: 3444
- 6 Nicolajsen, H.; Hvidt, A. *Cryobiology*, **1994**, **31**: 199
- 7 Izutsu, K.; Yoshioka, S.; Kojima, S. *Chem. Pharm. Bull.*, **1995**, **43**: 1804
- 8 Han, B.; Devireddy, R. V.; Bischof, J. C. Phase change behavior of biomedically relevant solutions, ASME 2002 international mechanical engineering congress and exposition, IMECE'02, New Orleans, Louisiana, 2002: 32564
- 9 Gao, C.; Zhou, G. Y.; Xu, Y.; Hua, Z. Z. *Acta Phys. -Chim. Sin.*, **2004**, **20**(2): 123 [高才, 周国燕, 胥义, 华泽钊. 物理化学学报(*Wuli Huaxue Xuebao*), **2004**, **20**(2): 123]
- 10 Gao, C.; Wang, W. H.; Hu, T. J.; Xu, Y.; Zhou, G. Y.; Hua, Z. Z. *Acta Phys. -Chim. Sin.*, **2004**, **20**(7): 701 [高才, 王文华, 胡桐记, 胥义, 周国燕, 华泽钊. 物理化学学报(*Wuli Huaxue Xuebao*), **2004**, **20**(7): 701]
- 11 Hua, Z. Z.; Ren, H. S. *Cryobiology and cryomedicine technology*. Beijing: Science Press, 1994: 149-230 [华泽钊, 任禾盛. 低温生物医学技术. 北京: 科学出版社, 1994: 149-230]
- 12 O'Neill, M. J.; Watson, E. S. *Anal. Chem.*, **1964**, **36**: 1238
- 13 Chen, N. J.; Morikawa, J.; Hashimoto, T. *Thermochimica Acta*, **2005**, **431**: 106
- 14 MacFarlane, D. R. *Cryobiology*, **1987**, **24**: 181
- 15 Echlin, P. *Low-temperature microscopy and analysis*. New York: Plenum Press, 1992: 141-191
- 16 Rasmussen, P. H.; Jorgensen, B.; Nielsen, J. *Thermochimica Acta*, **1997**, **303**: 23
- 17 Spencer, J. N.; Berger, S. K.; Powell, C. R.; Henning, B. D. *J. Phys. Chem.*, **1981**, **85**: 1236
- 18 de Visser, C.; Heuvelsland, W. J. M. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **1978**, **74**: 1159
- 19 Wilson, P. W.; Arthur, J. W.; Haymet, A. D. J. *Biophys. J.*, **1999**, **77**: 2850
- 20 Gao, C. Ph. D. Dissertation. Shanghai: Shanghai University of Science and Technology, 2004 [高才. 博士学位论文. 上海: 上海理工大学, 2004]
- 21 Cock, F. H.; Brower, W. E. *Cryobiology*, **1974**, **11**: 340