

亲水性高分子对冰重结晶的抑制作用研究

薛 涵, 贺志远*, 吴书旺, 吕健勇, 王健君*

(中国科学院化学研究所, 北京 100190)

摘要:研究了聚丙烯酸、聚丙烯胺、聚乙烯醇三种亲水性高分子对冰重结晶过程的影响。结果表明,随着溶液浓度的增加,三种高分子对冰重结晶的抑制作用均逐渐增强。不同侧链基团会影响高分子对冰重结晶过程的调控效果,聚丙烯胺和聚丙烯酸没有明显抑制冰重结晶的效果,而聚乙烯醇具有很强的抑制冰重结晶的能力。对不同醇解度的聚乙烯醇研究发现,聚乙烯醇抑制冰重结晶的效果会随着醇解度的提高而不断增强。通过研究水分子的质子自旋-自旋弛豫时间(T_2)发现:高羟基含量的聚乙烯醇可以更加有效地限制水的扩散运动,从而抑制冰重结晶。

关键词:亲水性高分子; 冰重结晶抑制; 水分子动力学

低温冷冻保存技术在食品保鲜、遗传育种、珍稀动植物资源保护以及人体器官移植等诸多领域具有重要意义。冷冻伤害主要来自于降温与复温的温度变化过程,因此,保存过程中的关键因素是控制细胞内/外部的冰晶尺寸与数量,进而减小冰晶生长对细胞造成的破坏。快速冷冻过程中,细胞内会不可避免的形成微小冰晶,这些微晶不至于造成细胞损伤。但是,在升温解冻过程中,这些微小冰晶在奥斯瓦尔德熟化(Ostwald ripening)效应的驱动下会发生重结晶现象,体系中较大尺寸的冰晶通过融合较小尺寸冰晶的方式逐步生长,所生成的大冰晶会破坏细胞结构,进而对细胞造成致死性伤害。冰重结晶造成的细胞冷冻伤害导致基于细胞移植的再生疗法等医疗技术的应用受到极大限制^[1~3]。因此,高效冰重结晶抑制剂的研发对推进现代医学的发展意义重大。

广泛存在于极地鱼类、越冬植物、抗寒动物、细菌和病毒等生物体内的抗冻蛋白被证明具有良好的抑制冰重结晶的效果。但是,“热滞后特性”和高昂的价格阻碍了抗冻蛋白的广泛应用^[4~7]。近年来,具有高抗冻活性的合成高分子的研发引起了科研工作者的广泛兴趣,并展现出了巨大的应用前景^[8]。本文对比研究了三种典型亲水性高分子聚丙烯酸(PAA)、聚丙烯胺(PEI)和聚乙烯醇(PVA)对冰重结晶的抑制作用,发现PVA具有显著抑制冰重结晶的效果。进而,系统地研究了不同醇解度对PVA抑制冰重结晶作用的影响,并通过核磁共振氢谱法($^1\text{H-NMR}$)分析水分子的质子自旋-自旋弛豫时间(T_2),探究水分子运动能力差异对冰重结晶过程的影响。

1 实验

1.1 原料及试剂

聚乙烯醇PVA(重均分子量50K,醇解度99%),聚丙烯胺PEI(重均分子量65K),聚丙烯酸PAA(重均分子量100K)均购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;不同醇解度聚乙烯醇PVA(醇解度40%、50%、80%和88%)均购自可乐丽国际贸易(上海)有限公司;固体碘(纯度98%)购自北京百灵威科技有限公司,硼酸(分析纯),碘化钾KI(分析纯)购自北京化工厂。

1.2 主要实验设备

10.14028/j.cnki.1003-3726.2016.09.014

收稿:2016-05-19;修回:2016-06-28;

基金项目:国家973计划(2012CB933801, 2013CB933004),国家自然科学基金(51436004, 21421061, 2150030233);

作者简介:薛涵(1993-),男,硕士,主要从事防覆冰材料的研究,E-mail:15620629105@163.com;

* 通讯联系人:贺志远,博士,助理研究员,主要研究方向为高聚物在防冰中的应用,E-mail:hezy@iccas.ac.cn;王健君,博士,研究员,主要从事防覆冰界面材料的研究,E-mail:wangj220@iccas.ac.cn.

Linkam LTS420 冷台,英国林克曼公司;Multizoom AZ100 多功能变倍显微镜,尼康仪器(上海)有限公司;BRUKER AVANCE 600 液体核磁共振谱仪,德国布鲁克公司。

1.3 实验方法

1.3.1 Splat-assay 冷台实验与冰畴尺寸统计 如图1所示,采用 Splat assay 方法对冰重结晶进行研究。^[9]将盖玻片放置于 Linkam LTS420 冷台上,以 $20^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 降温至不同淬火温度,并恒温保持 60s。将 $10\mu\text{L}$ 样品溶液从固定高度($h=1\text{m}$)滴落,使其在盖玻片上形成厚度约为 $10\mu\text{m}$ 的均匀冰膜。然后,将样品以 $15^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温至 -6°C ,恒温保持不同时间,采用偏光显微镜对重结晶过程中冰畴的尺寸和形貌进行“原位实时”观测。采用平均最大粒径(MLGS)统计方法,通过 Image J 软件对冰畴的尺寸进行多次统计,得到 MLGS 尺寸平均值。通常情况下,实验以 NaCl 溶液作为参比,采用样品重结晶后的冰畴尺寸与标准 NaCl 溶液冰畴尺寸的相对值表征重结晶的抑制效果^[9]。

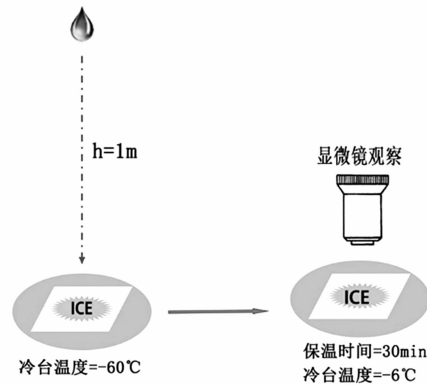


图1 Splat assay 冷台实验示意图
Figure 1 Diagram of splat assay

1.3.2 自旋-自旋弛豫时间(T_2)的测量 ^1H -NMR 测试在 BRUKER AVANCE 600M 核磁谱仪上完成,试验温度为室温。水分子的质子自旋-自旋弛豫时间(T_2)采用 Carr-Purcell-Meiboom-Gill(CPMG)自旋回波序列,通过测量回波幅度随自旋回波衰减时间变化,由单指数衰减拟合得到^[10,11]。

2 结果与讨论

2.1 亲水性高分子对冰重结晶过程的影响

亲水性高分子侧链基团的差异会对高分子与水分子的相互作用产生显著的影响。在冰重结晶过程中,冰畴界面的水分子存在大量的无规热运动,通过调控界面水的运动可以有效控制冰重结晶过程。通过对比三种具有典型亲水性官能团(羧基、氨基和羟基)的高分子溶液(PAA、PEI 和 PVA)的冰重结晶行为发现,不同亲水性高分子对冰重结晶的抑制作用存在显著差异。图2为 $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ NaCl 溶液和 $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ PAA、PEI 和 PVA 溶液,在 -60°C 淬火,随后在 -6°C 重结晶 30min 的偏光显微镜形貌图。如图2所示, $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ NaCl 对照溶液重结晶后的冰畴平均尺寸最大;PAA 和 PEI 对冰的重结晶抑制作用较小,两种高分子溶液在 $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,冰畴平均尺寸相近;同 PAA 和 PEI 相比,PVA 具有更好的抑制冰重结晶的效果,冰畴平均尺寸小于 $50\mu\text{m}$ 。

2.2 淬火温度和重结晶时间的变化对冰重结晶过程的影响

冰的重结晶过程同时受到初始冰晶结构(由淬火温度控制)和重结晶时间的影响。为了更加系统的比较 PAA、PEI 和 PVA 抑制冰重结晶效率的差异,我们研究了不同的淬火温度和重结晶时间对冰畴尺寸的影响。由图3(a)可知,在淬火温度不断降低的过程中,冰畴尺寸呈现先下降后稳定的趋势,当淬火温度低于 -60°C 时,冰畴平均尺寸基本相同。在本实验所选择的温度区间内($-80^{\circ}\text{C}\sim-40^{\circ}\text{C}$),淬火温

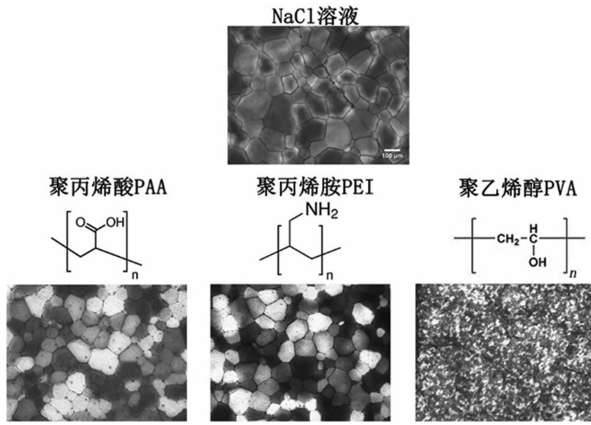


图 2 NaCl 溶液和 PAA、PEI 和 PVA 高分子溶液的重结晶形貌

(注:NaCl 溶液浓度 $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 高分子溶液浓度 $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 标尺 $100\mu\text{m}$)

Figure 2 Optimal micrographs of poly-nucleated ice crystals of NaCl, PAA, PEI and PVA solutions (concentration of NaCl, PAA, PEI and PVA solutions= $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, scale bar= $100\mu\text{m}$)

度变化对冰畴尺寸影响较小。由图 3(b)可知,PAA、PEI 和 PVA 三种体系的初始冰畴尺寸基本相同。随着重结晶时间的不断延长,PAA 与 PEI 体系的冰畴尺寸快速增长,并在 30min 后逐渐趋于饱和;相反,PVA 体系的冰畴尺寸增长速率较为缓和,并在较短时间内($<10\text{min}$)达到饱和。综上,我们选择 -60°C 与 30min 作为后续实验的淬火温度与重结晶时间。

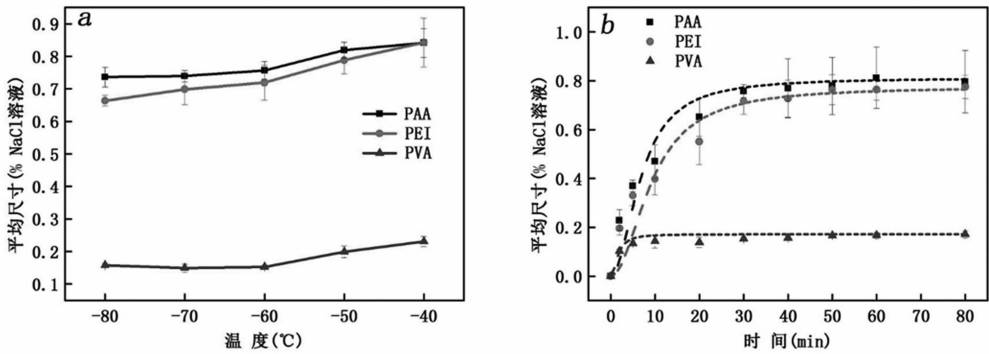


图 3 淬火温度和重结晶时间的变化对冰重结晶过程的影响

Figure 3 Effect of quenching temperature and ice recrystallization periods on the process of ice recrystallization

图 4 为不同溶液浓度条件下,PAA、PEI 和 PVA 高分子溶液重结晶后的冰畴 MLGS 尺寸统计。三种高分子对冰重结晶的抑制效率为:PAA<PEI<PVA,且该趋势对所有的实验浓度都适用。随着溶液浓度的增加($0.1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}\sim 10\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),三种体系的冰畴平均尺寸都逐渐降低。因为随着溶液浓度的升高,高分子在冰畴之间过渡水层中的浓度也会随之升高,形成局部高分子组分的富集区,使水分子的扩散减慢,从而阻碍冰畴边界的生长达到抑制冰重结晶的效果。事实上,PVA 高效抑制冰重结晶的能力取决于 PVA 与水分子的相互作用,同时受 PVA 分子链的空间构型与构象、分子量以及醇解度等多种因素影响^[12]。Inada 等^[13]发现分子量越高的 PVA 抑制冰重结晶的能力越强,并认为 PVA 的羟基与冰的晶格匹配度较好。但是,关于 PVA 醇解度差异如何影响冰的重结晶过程还缺乏系统的研究。

2.3 不同醇解度聚乙烯醇对冰重结晶过程的影响

如图 5 所示,商品化的 PVA 分子中同时含有羟基和乙酰基,两种基团的比例采用醇解度表示,例如,醇解度为 99%代表 PVA 主链中羟基含量为 99%。

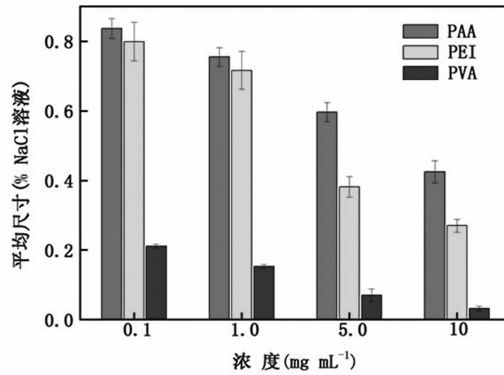


图4 不同高分子抑制冰重结晶效果

Figure 4 Ice recrystallisation inhibition activity of PAA, PEI and PVA

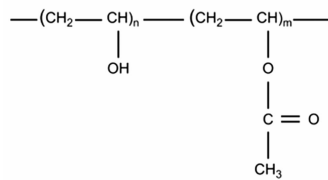


图5 聚乙烯醇结构示意图

Figure 5 Chemical structure of PVA

图6(a)、(b)和(c)分别代表 $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 50%、80%和99%醇解度PVA溶液重结晶后的冰畴形貌图。可以看出,随着PVA醇解度的升高冰畴尺寸逐渐减小,羟基含量的变化对PVA抑制冰重结晶的效果影响显著。如图6(d)所示,不同浓度条件下,不同醇解度PVA对冰重结晶过程的影响。结果显示,在分子溶液浓度相同时,随着醇解度的不断提高,PVA对冰重结晶过程的抑制作用逐渐增强。当醇解度达到99%时,PVA表现出最佳的抑制效果,这与Gibson等^[14]所得到的实验结果吻合。随着溶液浓度的不断提高,PVA对冰重结晶的抑制效果越来越显著;当PVA醇解度为99%、溶液浓度为 $5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,冰畴平均最大尺寸约为0.1(相对于NaCl溶液)。同乙酰基相比,羟基具有更强的亲水性,醇解度的升高有利于PVA限制水分子的运动,从而更加有效地抑制冰重结晶过程。

2.4 不同醇解度PVA对水分子运动能力的影响

冰重结晶过程强烈依赖于冰畴间过度水层中水分子的运动能力。¹H-NMR质子自旋-自旋弛豫时间(T_2)测定是研究水分子动力学性质的有效手段。通常采用弛豫时间(T_2)或弛豫速率($R_2 = 1/T_2$)表征分子运动的快慢。根据Bloembergen^[15]报道的分子运动相关时间(τ_c)与 T_2 的关系可知,随着 τ_c 升高 T_2 单调下降,意味着 T_2 延长对应于分子运动能力变快。事实上,PVA与水分子体系的质子交换较为复杂,同时存在PVA主链羟基与水分子的质子交换以及水分子间的质子交换过程,所以,实验得到的 T_2 只能反映体系中具有多种运动模式的水分子的动力学平均状态。

如图7所示,在不同醇解度的PVA体系中(醇解度50%、80%和99%),峰强随时间均满足单指数衰减函数。根据拟合结果可知,当PVA醇解度为50%、80%和99%时,对应的弛豫时间(T_2)分别为1232ms、642ms和398ms。随着PVA醇解度的升高, T_2 逐渐减小(R_2 逐渐增大),说明随着PVA侧链的羟基含量升高,水分子的运动能力逐渐减弱。因为,与乙酰基相比,PVA侧链的羟基会与水分子产生更强的氢键相互作用,随着羟基含量的提高,PVA对水分子的束缚能力大大加强,进而更加有效地抑制冰重结晶过程。

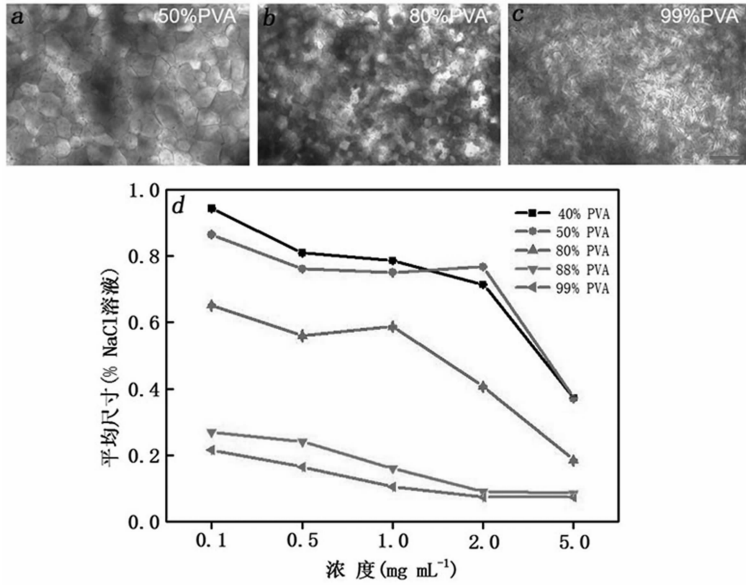


图 6 不同醇解度聚乙烯醇对冰重结晶过程的影响
(注:图中标尺 200 μ m)

Figure 6 Ice recrystallisation inhibition activity of PVA with different alcoholysis degree
(scale bar = 200 μ m)

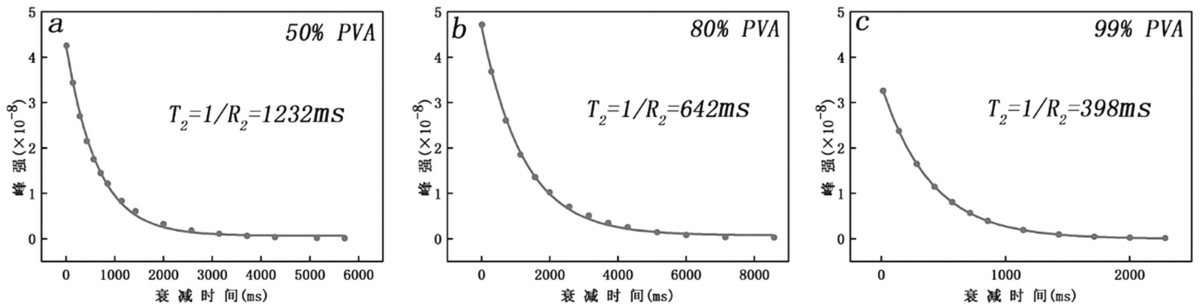


图 7 不同醇解度 PVA 样品溶液的弛豫衰减曲线

Figure 7 Relaxation delay curve of PVA samples with different alcoholysis degree

3 结论

随着高分子溶液浓度的增加,冰的重结晶过程均会受到不同程度的抑制,对于 PAA、PEI 和 PVA 三种亲水性高分子,PVA 表现出较强抑制冰重结晶的能力,PAA 和 PEI 没有明显抑制冰重结晶的特性。PVA 抑制冰重结晶的效果会随其醇解度提高而得到加强,当 PVA 醇解度为 99%、溶液浓度为 5mg \cdot mL⁻¹时,统计得到的冰畴平均尺寸最小(约为 30 μ m)。随着 PVA 醇解度不断升高,溶液中水分子的质子自旋-自旋弛豫时间(T_2)会不断减小,对应于水分子的运动能力逐渐减弱。高羟基含量的聚乙烯醇可以更加有效地限制水的运动能力,进而抑制冰重结晶过程。

参考文献:

[1] Wolfe R A, Roys E C, Merion R M. Am J Transplant, 2010, 10, 961.
[2] Atala A. J Tissue Eng Regen Med, 2007, 1, 83.

- [3] Ringe J, Kaps C, Burmester G R, Sittinger M. *Naturwissenschaften*, 2002, 89, 338.
- [4] Sutton R L, Lips A, Piccirillo G, Sztehlo A. *J Food Sci*, 1996, 61, 741.
- [5] Pronk P, Ferreira C A I, Witkamp G J. *J Cryst Growth*, 2005, 275, 1355.
- [6] Hagiwara T, Hartel R, Matsukawa S. *Food Biophys*, 2006, 1, 74.
- [7] Knight C A, Devries A L, Oolman L D. *Nature*, 1984, 308, 295.
- [8] Wu Y, Banoub J, Goddard S V, Kao M H, Fletcher G L. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2001, 128, 265.
- [9] Knight C A, Hallett J, DeVries A L. *Cryobiology*, 1998, 25, 55.
- [10] Balcerzak A K, Febraro M, Ben R N. *RSC Adv*, 2013, 3, 3232.
- [11] Congdon T, Notman R, Gibson M I. *Biomacromolecules*, 2013, 14, 1578.
- [12] Budke C, Koop T. *Chem Phys Chem*, 2006, 7, 2601.
- [13] Inada T, Lu S S. *Chem Phys Lett*, 2004, 394, 361.
- [14] Congdon T, Notman R, Gibson M I. *Biomacromolecules*, 2013, 14, 1578.
- [15] Bloembergen N. *Phys Rev*, 1956, 104, 1542.

Ice Recrystallisation Inhibition by Hydrophilic Polymers

XUE Han, HE Zhi-yuan* , WU Shu-wang, LÜ Jian-yong, WANG Jian-jun*

(*Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China*)

Abstract: The effect of poly(acrylic acid) (PAA), poly(allylamine) (PEI) and poly(vinyl alcohol) (PVA) on the ice recrystallization (IR) were studied. The results showed that the IR inhibition activity gradually increased with the increase of polymer solution concentration. Compared with the weak IR inhibition activity of PAA and PEI, PVA was a very effective inhibitor of IR. PVA with higher alcoholysis degree could inhibit IR much more effectively. The water mobility was detected by $^1\text{H-NMR}$, namely, water proton spin-spin relaxation times (T_2). As the proportion of hydroxyl groups increased, the IR inhibition activity of PVA increased due to the reduced mobility of water molecules.

Key words: Hydrophilic polymers; Ice recrystallisation inhibition; Water molecular dynamics