

# 氧化石墨烯对 VS55 冻融过程结晶行为的影响

雒苗苗<sup>1,2</sup>, 郭宁<sup>1</sup>, 胥义<sup>1\*</sup>, 刘道平<sup>2</sup>,

(1 上海理工大学生物系统热科学研究所, 上海 200093)

(2 上海理工大学制冷及低温工程研究所, 上海 200093)

**摘要:** 借助差示扫描量热仪 (DSC) 和低温显微系统, 研究了升降温速率 (5°C/min、10°C/min、25°C/min、50°C/min 和 100°C/min) 和氧化石墨烯 (graphene oxide, GO) 浓度 (0.01mg/ml、0.1 mg/ml、1mg/ml 和 5mg/ml) 对 VS55 溶液降温过程结晶和升温过程冰晶再生长的影响。结果表明: (1) 随着升降温速率的增加, VS55 溶液体系在降温过程中的结晶焓  $H_f$  以及升温过程中的再结晶焓  $H_{Td}$  都会减小。(2) 对浓度为 2.1M 的 VS55 溶液进行降温时, GO 浓度越大, 其结晶焓  $H_f$  越大, 且初始冻结温度显著提高; 但对 4.2M VS55 降温时, 其结晶焓  $H_f$  会随着 GO 浓度增加呈现出先减小后增大的特点; GO 对 8.4M VS55 的冻结过程没有任何影响; (3) 在升温过程中, GO 浓度越高, VS55 浓度越低, 其溶液体系内冰晶再生长抑制程度越大。总体来看, GO 对 VS55 溶液降温过程冰晶生长特点的影响主要取决于 VS55 浓度和 GO 浓度, 但对复温过程冰晶再生长特点的影响主要取决于 VS55 浓度、GO 浓度以及升降温速率。这些结论对于探索基于 GO 的低浓度、低毒性低温保护剂的方案提供重要指导意义。

**关键词:** 结晶焓; 氧化石墨烯; 反玻璃化; VS55

## EFFECTS OF GRAPHENE OXIDE ON THE CRYSTALLIZATION BEHAVIOR OF VS55 DURING COOLING AND WARMING

Luo Miaomiao Guo Ning Xu Yi Liu Daoping

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

**Abstract** The effects of cooling and warming rates (5°C/min, 10°C/min, 25°C/min, 50°C/min and 100°C/min) as well as the concentration of graphene oxide (GO) (0.01mg/ml, 0.1 mg/ml, 1mg/ml and 5mg/ml) on the crystallization of VS55 were studied by Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Cryomicroscope during both cooling and warming process. The results showed that: (1) As cooling and warming rates rised, both the freezing crystallization enthalpy  $H_f$  and the recrystallization enthalpy  $H_{Td}$  became smaller. (2) For the case of cooling 2.1M VS55, the larger the concentration of GO, the more the crystallization of the 2.1M VS55 solution was, and the initial freezing temperature of the solution was increased obviously. For 4.2M VS55, however, the crystallization enthalpy  $H_f$  presented a trend of first dropping then rising when increasing GO concentrations. And GO has little effect on both freezing crystallization during cooling and recrystallization during warming for 8.4M VS55. (3) For the cases of higher concentrations of GO as well as lower concentrations of VS55, the crystal growth inside VS55 was inhibited more significantly during warming. In general, GO and VS55 concentrations mainly affect the growth of ice crystals during the cooling process, but the main factors, which affects the devitrification or recrystallization during the rewarming process, include the concentration of VS55 and GO as well as the cooling and warming rates. These conclusions provide a proof for exploring a new cryoprotectant protocol with low toxicity by GO.

**Key words** crystallization enthalpy graphene oxide devitrification VS55

中图分类号: O645.5

\*Corresponding author. E-mail: xuyi@usst.edu.cn; Tel.: 021-55270218

The project was supported by the National Natural Science Foundation of China (51576132).

国家自然科学基金资助项目 (51576132)

## 0 引言

迄今为止，玻璃化保存仍然是细胞、组织或器官长期低温保存的最好方式<sup>[1,2]</sup>。为了实现生物样品的玻璃化保存，往往会采用较高浓度的玻璃化溶液<sup>[1,3,9]</sup>。然而，许多研究表明<sup>[4-11]</sup>：采用较高浓度低温保护剂的确有利于形成玻璃态，但同时也会因为低温保护剂浓度过高而造成生物毒性。为此，通常的做法是采用配制混合溶液体系的方法，这既有利于形成玻璃态，又降低保护剂的毒性。其中，VS55 就是一种经典的玻璃化溶液，目前已被成功应用于血管、皮肤等材料的玻璃化保存<sup>[12-14]</sup>。后续的研究表明，虽然高浓度 VS55 溶液在较低的降温速率下可以实现玻璃化保存，但是在升温过程中还是容易出现冰晶的再生长和重结晶现象，从而使生物样品发生不可逆损伤<sup>[8,15-19]</sup>。

最近，Geng 等人的研究发现<sup>[20,21]</sup>，氧化石墨烯材料可以很好地抑制冰晶的生长和重结晶，并在较低浓度低温保护剂中添加少量的氧化石墨烯，可以使得马精子低温保存后的活力显著增加。这为探索低温保护剂保护效果提供了一种新思路。尽管他们认为氧化石墨烯可以具备像抗冻蛋白一样抑制冰晶生长的能力，但其保护机理还有待深入研究。尤其是，氧化石墨烯对低温保护剂冻结过程的结晶行为以及熔融过程的反玻璃化或再结晶行为的影响程度，至今鲜有文献报道。

鉴于此，本文拟借助差示扫描量热法（DSC）和低温显微系统，探索氧化石墨烯对 VS55 溶液冻结以及反玻璃化过程结晶焓的影响，有望为研究低浓度、低毒性的低温保护剂方案提供重要指导意义。

## 1 实验材料与方法

### 1.1 试剂

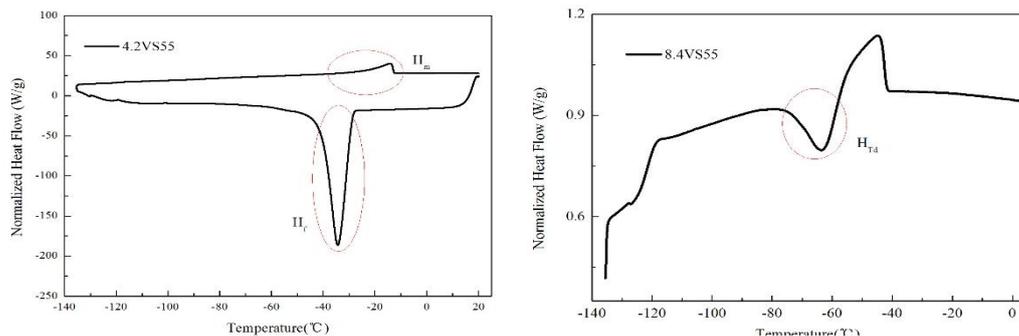


图 1 VS55 溶液的 DSC 曲线图

Fig.1 Heat flow curves of VS55 by DSC

VS55 浓度为 8.4 M，含有二甲基亚砜（3.1M）、甲酰胺（3.1 M）、1,2-丙二醇（2.2M）和 EuroCollins 等成分。2.1M 和 4.2M VS55 溶液都是由 8.4M VS55 溶液稀释而成。氧化石墨烯（Graphene Oxide, GO）相对密度为 1.9g/cm<sup>3</sup>，质量分数为 1wt%，大小 0.5 $\mu$ m。混合溶液中氧化石墨烯的浓度为 0.01mg/ml、0.1 mg/ml、1mg/ml 和 5mg/ml。

### 1.2 实验设备及测试方法

#### (1) 差示扫描量热仪

对低温保护剂溶液进行热分析，采用差式扫描量热仪（DSC8500，美国 PE 公司），其工作温度范围为 -170 $^{\circ}$ C~730 $^{\circ}$ C，升降温扫描速率为 0~100 $^{\circ}$ C/min，温度精度 0.01 $^{\circ}$ C，热焓精度为 99.9999%。在每次测试之前都要提前标定温度和热焓。

采用 DSC8500 进行连续扫描，在室温 25 $^{\circ}$ C 等温 1min，连续降温到 -135 $^{\circ}$ C，并等温 1 min，之后连续升温到 25 $^{\circ}$ C，升降温速率分别 5 $^{\circ}$ C/min、10 $^{\circ}$ C/min、25 $^{\circ}$ C/min、50 $^{\circ}$ C/min 和 100 $^{\circ}$ C/min。如图 1(a)所示为低浓度 VS55 溶液（2.1M 和 4.2M）DSC 曲线，图（b）表示 8.4M VS55 溶液 DSC 曲线。由于低浓度 VS55 在降温过程中就已实现冰晶成核及一定程度的生长，而在复温过程中 DSC 不能测出反玻璃化结晶焓，但可能存在冰晶再生长，其结晶焓可记为  $H_{Td}$ ， $H_{Td}=H_m-H_f$  其中， $H_m$ -复温过程中的熔融焓， $H_f$ -降温过程中的结晶焓；而对于高浓度 VS55，降温过程已实现完全玻璃化，但复温存在反玻璃化，其结晶焓为  $H_{Td}$ 。

#### (2) 低温显微系统

对冰晶生长的观察采用低温显微系统（BCS196 Biological Cryo-stage，英国 Linkam 公司），其工作

温度范围为-196~125℃，升降温扫描速率为 0.01~150℃/min。

在进行低温显微观察时，由于低浓度 VS55 只能观察到降温过程中的结晶现象，所以，2.1M 和 4.2M 的样品均是以 50℃/min 降温时采集结晶图像，但其采集图像的时间间隔分别为 0.1s 和 1s。而对于 8.4M VS55 溶液来讲，很难在降温过程中产生结晶，因此只观察其反玻璃化过程的结晶行为，即将样品以 5℃/min 降温到-135℃，并以 10℃/min 升温到反玻璃化温区采集图像，时间间隔为 1s。

## 2 结果与讨论

### 2.1 VS55 溶液冻结及反玻璃化过程的结晶焓

图 2 所示为降温速率对 VS55 溶液冻结过程结晶焓的影响。由于 8.4M VS55 的浓度足够高，以 5℃

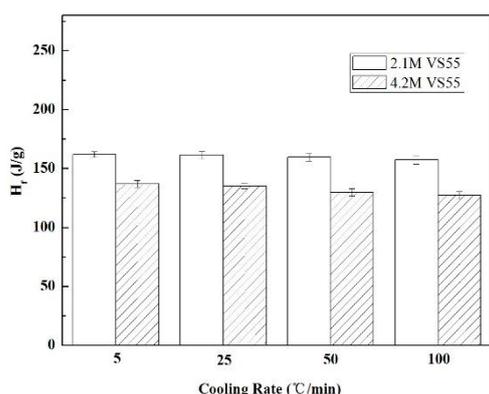


图 2 降温速率对 VS55 溶液冻结结晶焓的影响

Fig.2 The effect of cooling rates on the freezing crystallization enthalpy of VS55

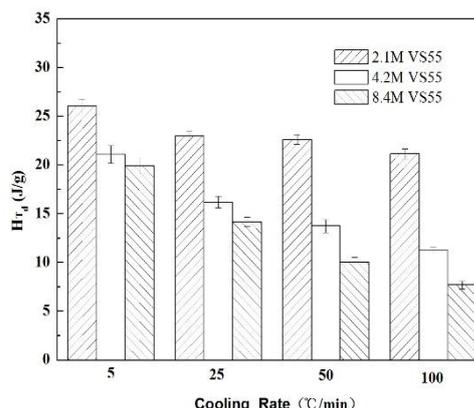


图 3 降温速率对 VS55 溶液反玻璃化结晶焓的影响

Fig.3 The effect of cooling rates on the recrystallization enthalpy of VS55

/min 降温时不会出现明显的结晶放热现象。因此，图 2 中只呈现出 2.1M 和 4.2M 两个浓度的实验结果。很明显，随着降温速率的增加，VS55 溶液在降温过程的结晶焓均略微降低。例如，2.1M 结晶焓由 161.36J/g (@5℃/min) 降低为 157.32J/g (@5℃/min)，4.2M 由 134.96J/g (@5℃/min) 降低为 127.32J/g (@5℃/min)。这是因为降温速率越大，越容易快速通过溶液的结晶温区，使之来不及结晶导致结晶量会有所减小<sup>[22]</sup>。此外，在相同降温速率下，VS55 浓度越低，其结晶焓越大，这是因为低浓度 VS55 含有更多的自由水参与了降温过程的结晶<sup>[23]</sup>。

图 3 所示为降温速率对 VS55 溶液反玻璃化结晶焓的影响（注：升温速率均为 5℃/min）。从图中可以看出两点：（1）随着降温速率的增加，VS55 溶液的 H<sub>rd</sub> 均会显著减小；（2）VS55 浓度越高，其 H<sub>rd</sub> 减小程度也越大。例如，2.1M 的 H<sub>rd</sub> 由 26.04J/g (@5℃/min) 减小到 21.12J/g (@100℃/min)；4.2M 由 21.08J/g 减小为 11.24J/g；8.4M VS55 由 19.92J/g 减小为 7.67J/g。

Yavin 等人的研究表明<sup>[10]</sup>，溶液冻结是否能形成玻璃态主要取决于三个因素：黏度、升降温速率、样品体积。由于高浓度 VS55 具有黏度高等特点，当降温速率越快时，玻璃化程度也越高，其对应复温过程中的反玻璃化现象就会越弱。这也就解释了图 3 中为何 VS55 浓度越高，降温速率越快，其反玻璃化结晶焓会显著减小的原因<sup>[24]</sup>。

图 4 表示升温速率对 VS55 溶液反玻璃化结晶焓的影响（注：降温速率均为 5℃/min）。很显然，随着升温速率的增加，VS55 的 H<sub>rd</sub> 均会显著减小；且 VS55 浓度越高，其 H<sub>rd</sub> 减小程度也越显著。例如，2.1M 的 H<sub>rd</sub> 由 26.04J/g (@5℃/min) 减小到 18.28J/g (@100℃/min)；4.2M 由 21.08J/g 减小为 7.8J/g；8.4M 在 100℃/min 升温时反玻璃化现象完全消失。事实上，反玻璃化温度具有动力学特点，即升温速率越快，其反玻璃化温度也越高；当其接近熔融温度时，反玻璃化现象会逐渐减弱，甚至消失<sup>[24]</sup>。

### 2.2 氧化石墨烯对 VS55 溶液冻结过程结晶焓的影响

由于高浓度 VS55 (8.4M) 在降温过程中无明显的结晶现象，所以这里只讨论 2.1M 和 4.2M 两种情况。图 5 所示为 2.1M VS55+GO 溶液体系冻结过程的结晶焓和低温显微图像。从图 5 (a) 可以看出，随着降温速率增大，其结晶焓略微减小，添加 GO 促进了冰晶的形成和生长，且随着 GO 浓度增大，其

结晶焓也越大。图 5 (b) 表明随着 GO 浓度增高, 其初始冻结温度显著升高, 即由 $-45^{\circ}\text{C}$ 增大为 $-35^{\circ}\text{C}$ 。这说明 GO 的确促进了冰晶成核和生长, 这与图 5 (a) 所示结晶焓的变化趋势是一致的。

图 6 所示为 4.2M VS55+GO 溶液体系冻结过程的结晶焓和低温显微图像。从图 6 (a) 可以发现, 尽管降温速率对 4.2M VS55+GO 体系冻结过程结晶焓的影响也不大, 但随着 GO 浓度的增大, 其结晶焓呈现出先降低后升高的趋势。例如, 当降温速率为  $50^{\circ}\text{C}/\text{min}$  时,  $H_f$  由  $131.66\text{J/g}$  (4.2M VS55) 减小为  $104.72\text{J/g}$  (4.2M VS55+0.1 mg/mlGO) 后增大到  $126.97\text{J/g}$  (4.2M VS55+5 mg/mlGO)。其冻结过程显微图像(图 6(b)所示)表明, 添加 0.01 和 0.1mg/ml 的 GO 可以明显抑制冰晶生长, 但其浓度达到 1 mg/ml 后, 则呈现出促进冰晶生长的特点, 这也与图 6 (a) 所示结果相符合。这种现象可能与 GO 结构中含有大量的环氧基和羧基有关, 具体的机理分析和讨论将在后面阐述。

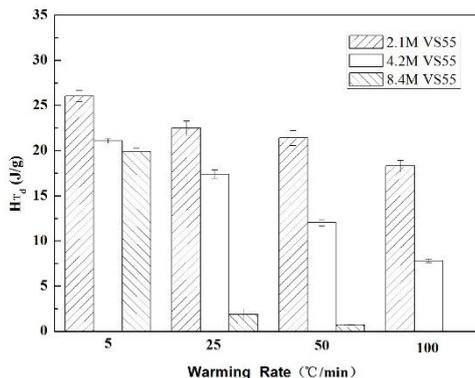


图 4 升温速率对 VS55 溶液反玻璃化结晶焓的影响

Fig.4 The effect of warming rates on the recrystallization enthalpy of VS55

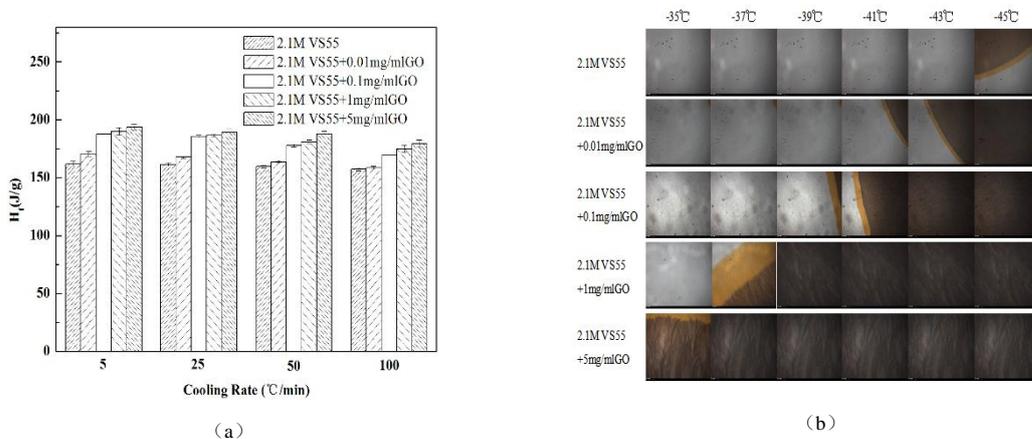


图 5 GO 对 2.1M VS55+GO 溶液体系冻结过程结晶的影响

Fig.5 The effect of GO on Crystallization of 2.1M VS55+GO during Freezing

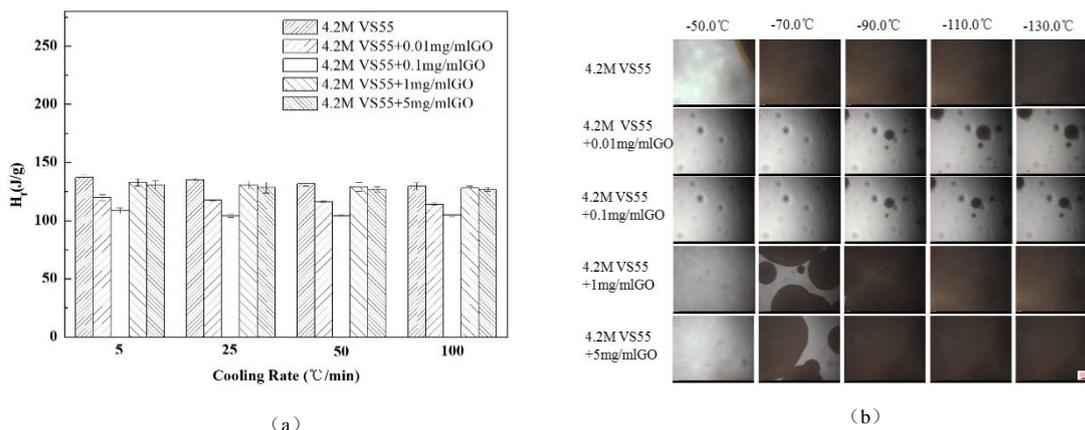


图 6 GO 对 4.2M VS55+GO 溶液体系冻结过程结晶的影响

Fig.6 The effect of GO on Crystallization of 4.2M VS55+GO during Freezing

## 2.3 氧化石墨烯对 VS55 溶液反玻璃化结晶焓的影响

### 2.3.1 降温速率的影响

图 7 (a-c) 所示为降温速率和 GO 浓度对 VS55 反玻璃化结晶焓的影响。从中可以看出，随着降温速率的增加，所有样品的  $H_{Td}$  均呈减小趋势，一旦加入 GO 后，其  $H_{Td}$  值随着 GO 浓度增大而显著降

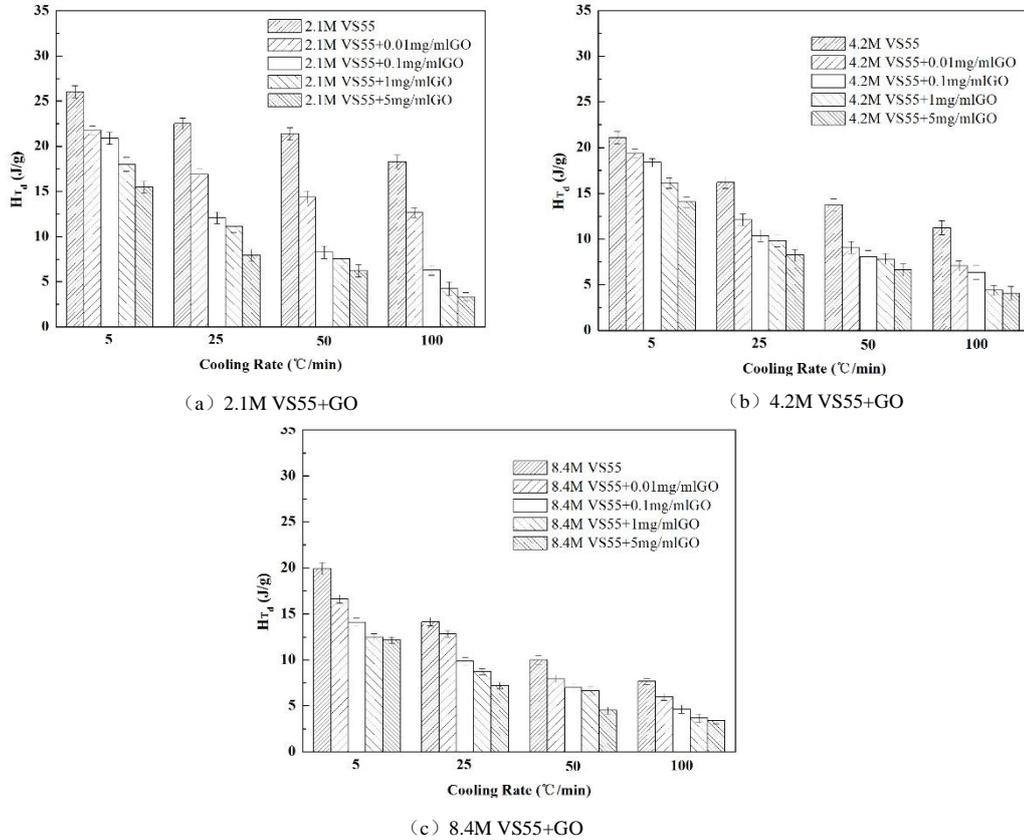


图 7 降温速率和 GO 浓度对 VS55 反玻璃化结晶焓的影响

Fig.7 The effect of cooling rates and GO on the recrystallization enthalpy of VS55

低。例如对于 2.1M VS55 当降温速率为  $50^{\circ}\text{C}/\text{min}$  时，其  $H_{Td}$  为  $22.59\text{J}/\text{g}$ ，而当 GO 浓度为  $5\text{mg}/\text{ml}$  时，其  $H_{Td}$  显著减小为  $8.98\text{J}/\text{g}$  ( $5\text{mg}/\text{mL}$ )。

GO 对 VS55 溶液复温过程冰晶生长的抑制效果如图 8 所示 (降温速率为  $25^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ，升温速率为  $5^{\circ}\text{C}$

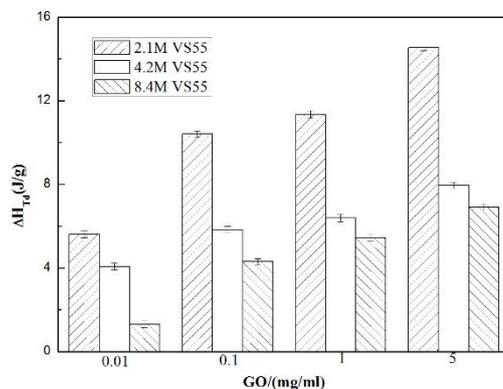


图 8 GO 对 VS55 溶液复温过程冰晶生长的抑制效果

Fig.8 The effect of GO on inhibition of ice crystal growth of VS55 during warming

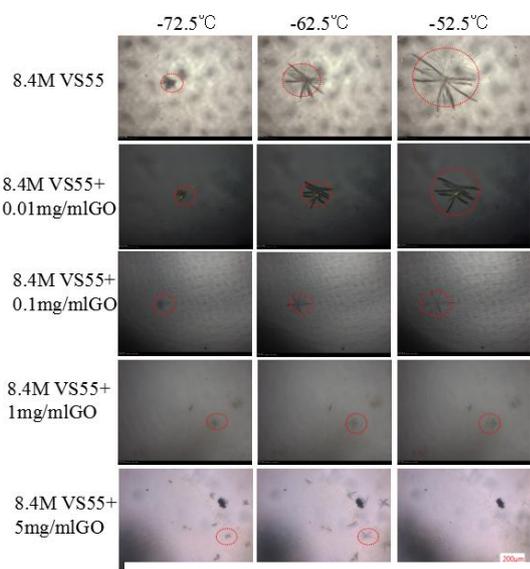
(Note:  $\Delta H_{Td} = H_{Td}(\text{VS55}) - H_{Td}(\text{VS55} + \text{GO})$ )

$/\text{min}$ )。图中  $\Delta H_{Td}$  代表 GO 对 VS55 溶液复温过程冰晶生长抑制的程度，即  $\Delta H_{Td}$  越大，意味着抑制效

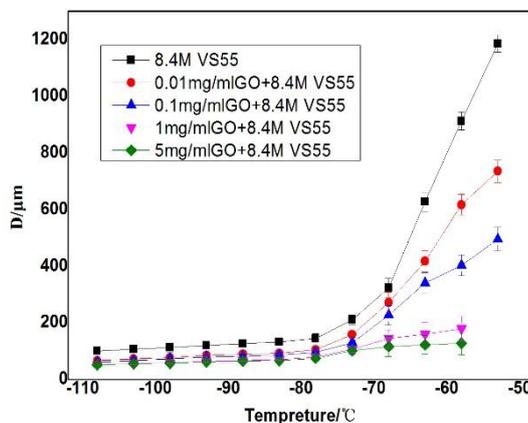
果越明显。从图中可以看出，GO 浓度越高， $\Delta H_{Td}$  越大，抑制效果越明显；且 VS55 浓度越低，GO 对其反玻璃化冰晶再生长的抑制作用越强。例如，当 GO 浓度为 5mg /mL 时，三个 VS55 浓度下的 $\Delta H_{Td}$  分别为 14.55J/g (2.1M VS55)、 7.95J/g (4.2M VS55) 和 6.91J/g (8.4M VS55)。这个结果给我们的启示是：通过添加适量的 GO 可以降低 VS55 的使用浓度，这对减弱低温保护剂浓度过高所带来的毒性损伤是有益的。

为了直观了解 VS55 在复温过程中的冰晶再生长现象，本文采用低温显微系统进行观察。因为 2.1M 和 4.2M VS55 溶液体系在降温过程中结晶，低温显微已观察不到升温过程的反玻璃化结晶，所以，以 8.4M VS55 为例观察其反玻璃化过程冰晶的生长。

图 9 (a) 为 8.4M VS55+GO 反玻璃化过程的冰晶生长情况。很显然，在相同的温度下，GO 浓度增高时，冰晶的尺寸减小但密度增加。例如当复温到-72.5℃时，8.4M VS55 溶液在视野中的冰晶只有 1 个，直径为 911.83 $\mu$ m；添加 5mg /mLGO 后，冰晶有 6 个，但直径显著减小为 102.46 $\mu$ m。从图 (b) 可以看出，所有样品复温到-80℃以后，冰晶直径均呈现幂指数生长的特点，但添加 GO 后显著抑制冰晶生长，与图 8 结果是一致的。



(a) 8.4M VS55+GO 冰晶生长显微观察



(b)8.4M VS55+GO 冰晶生长尺寸

图 9 GO 对 8.4M VS55 反玻璃化过程冰晶生长的影响

Fig.9 The effect ofGO concentrations on ice crystal growth of 8.4M VS55 during devitrification

### 2.3.2 升温速率的影响

图 10 所示为升温速率和 GO 浓度对 VS55 反玻璃化结晶焓的影响。从中可以看出，随着升温速率的增加，所有样品的  $H_{Td}$  均呈减小趋势，高浓度 VS55 减小更为显著。例如对于 2.1M VS55，当 GO 浓度为 1mg /mL 时，其  $H_{Td}$  由 18J/g (@5℃/min) 减小为 4.24J/g (@100℃/min)；而对于 8.4M VS55， $H_{Td}$  由 12.48J/g (@5℃/min) 减小为 0 (@100℃/min)。此外，升温速率相同的情况下，GO 浓度越高，其溶液体系的  $H_{Td}$  越小。例如对于 4.2M VS55，采用 50℃/min 的升温速率时，其  $H_{Td}$  由 21.59J/g(4.2M VS55) 减小到 6.22J/g (4.2M VS55+5mg /mLGO)。在玻璃化保存生物样品进行复温时，控制复温速率是至关重要的。尤其是要避免反玻璃化损伤，则需要保证升温速率不低于临界复温速率（临界复温速率是指在该复温速率下，低温保护剂的反玻璃化现象基本消失）。对于 8.4M VS55 来讲，其临界复温速率为 50℃ /min<sup>[25]</sup>。而从图 10 (c) 可以看出，8.4M VS55 在 50℃/min 的复温速率下，其  $H_{Td}$  为 0.53J/g；添加 0.1mg /mLGO，相同  $H_{Td}$  对应的复温速率只需要 25℃/min。这充分说明，添加 GO 可以显著降低临界复温速率，更有利于实现复温控制。

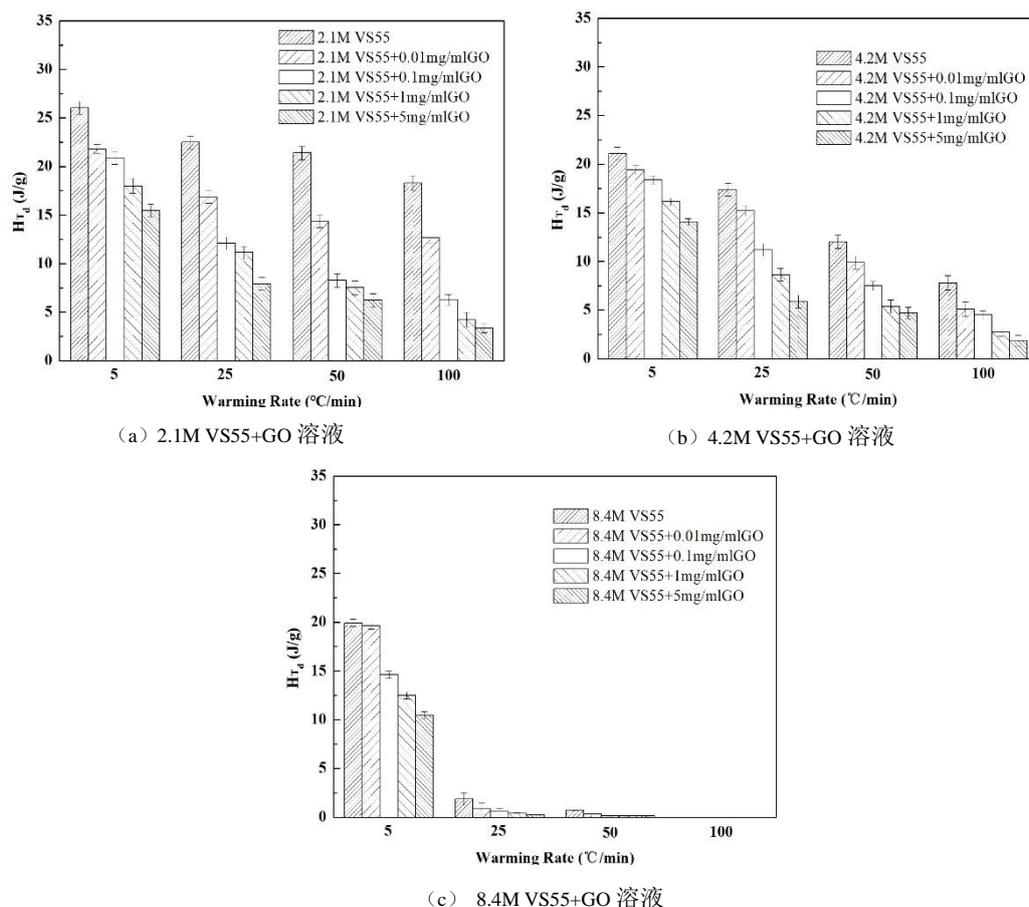


图 10 升温速率和 GO 浓度对 VS55 反玻璃化结晶焓的影响

Fig.10 The effect of warming rates and GO concentrations on the recrystallization enthalpy of VS55

### 3 氧化石墨烯影响溶液结晶行为的机理探讨

一般认为，氧化石墨烯为二维层状结构（见图 11），其含有大量的羟基（-OH），羧基（-COOH），环氧基活性基团（-O-）。因此，氧化石墨烯结构中同时存在氧化和未氧化部分，其中羟基和环氧基主要分布在中心氧化部分，羧基主要分布在其外围未氧化处<sup>[26-28]</sup>。已有研究表明<sup>[23,29-31]</sup>，氧化石墨烯结构中带负电的羧基或者其他官能团被羧基化后会成为冰晶的成核点，促进冰晶的各向异性成核和生长。如图 12（a）所示，氧化石墨烯内部是通过羧基之间的氢键线性连接，该结构与六角形冰聚体类似，从而有效地促进了冰晶的成核和生长，这能很好地解释 2.1M VS55 溶液在降温过程的结晶焓随着氧化石墨烯浓度增加而增大的现象（如图 5）。但是，这个结论又很难解释图 6 所描述的现象，至今鲜有文献报道，尚需进一步深入探索。

Geng 等人<sup>[21]</sup>的研究表明，氧化石墨烯吸附在冰晶表面时，存在开尔文效应，会改变冰晶表面的曲率，从而抑制了冰晶的生长（如图 12（b）所示）。基于该研究结论，不难解释本研究中 GO 可以抑制复温过程冰晶再生长的现象（2.3 部分）

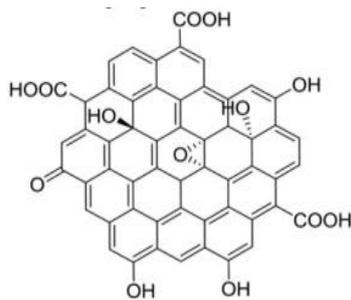
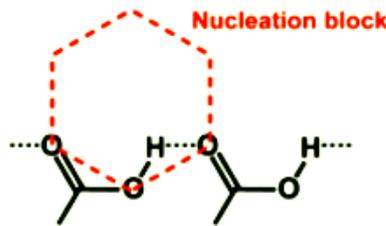
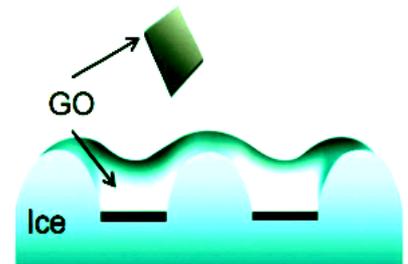


图 11 氧化石墨烯结构图

Fig.11 Structure of Graphene Oxide



(a) GO 促进降温过程冰晶形成的示意图



(b) GO 抑制复温过程冰晶生长的原理

图 12 氧化石墨烯影响 VS55 溶液升降温过程结晶的原理

Fig.12 The principle of crystallization of VS55 affected by GO

## 4 结论

本文采用差示扫描量热法 (DSC) 和低温显微系统, 较为系统地探索了氧化石墨烯 (GO) 对 VS55 溶液冻结和反玻璃化过程结晶焓的影响, 得出以下结论。

(1) 随着升降温速率的增加, VS55 溶液体系在降温过程中的结晶焓  $H_f$  以及升温过程中的再结晶焓  $H_{Td}$  都会减小。

(2) 在降温过程中, GO 浓度越大, 越能促进 2.1M VS55 溶液的结晶, 且显著提高了溶液的初始冻结温度, 但对于 4.2M VS55 溶液, 随着 GO 浓度增加, 其结晶焓呈现先减小后增大的特点, 相关机理有待进一步探索。

(3) 在升温过程中, GO 能显著抑制 VS55 溶液体系的冰晶再生长现象, 且 VS55 浓度越低, 其相对抑制程度越大。这说明添加 GO 可以适当地降低 VS55 的使用浓度, 从而减小毒性。

(4) 有关 GO 促进降温过程冰晶的成核以及抑制复温过程冰晶再生长的机理探索还有待进一步完善。

### 参考文献

- [1] Brockbank K G, Song Y C. Morphological analyses of ice-free and frozen cryopreserved heart valve explants.[J]. Journal of Heart Valve Disease, 2004, 13(2):297.
- [2] Taylor M J, Song Y C, Brockbank K G M. Vitrification in Tissue Preservation: New Developments[M]. 2004.
- [3] Fahy G M, Macfarlane D R, Angell C A, et al. Vitrification as an approach to cryopreservation[J].Cryobiology, 1984, 21(4):407-426.
- [4] Lee H J, Elmoazzen H, Wright D, et al. Ultra-rapid vitrification of mouse oocytes in low cryoprotectan concentrations.[J].Reproductive Biomedicine Online, 2010, 20(2):201-208.
- [5] 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.
- [6] Fowler A J, Toner M. Prevention of hemolysis in rapidly frozen erythrocytes by using a laser pulse[J].Annals of the New York Academy of Sciences, 1998, 858(1):245.
- [7] GOETZ, A. & S.S. GOETZ . 1938. Death by devitrification in yeast cells. Biodynamica 43: 1-8.
- [8] Bahari L, Braslavsky I. 136 The effect of antifreeze proteins on vitrification-devitrification processes in a micro-scale view[J]. Cryobiology, 2013, 67(3):436-437.
- [9] Jiao A, Han X, Critser J K, et al. Numerical investigations of transient heat transfer characteristics and vitrification tendencies in ultra-fast cell cooling processes[J].Cryobiology, 2006, 52(3):386.
- [10] Yavin S, Arav A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions.[J]. Theriogenology, 2007, 67(1):81-89.
- [11] Fahy G M, Wowk B, Wu J, et al. Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity.[J].Cryobiology, 2004, 48(1):22.
- [12] Song YC et al. Journal of investigative surgery. [J].2004;17(2):65-70.
- [13] Baicu S, Taylor M J, Chen Z, et al. Cryopreservation of carotid artery segments via vitrification subject to marginal thermal conditions: correlation of freezing visualization with functional recovery.[J]. Cryobiology, 2008, 57(1):1-8.
- [14] Song Y C, Khirabadi B S, Lightfoot F, et al. Vitreous cryopreservation maintains the function of vascular grafts[J]. Nature Biotechnology, 2000, 18(3):296.
- [15] Rabin Y, Bell E. Thermal expansion measurements of cryoprotective agents. Part II: measurements of DP6 and VS55, and comparison with DMSO [J]. Cryobiology, 2003, 46(3):254-263.
- [16] Zhang W, Yang G, Zhang A, et al. Preferential vitrification of water in small alginate microcapsules significantly augments cell cryopreservation by vitrification[J]. Biomedical Microdevices, 2010, 12(1):89-96.
- [17] Fowler A, Toner M. Cryo-injury and biopreservation.[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2005, 1066(1):119.
- [18] 张换成, 胥义. 深低温保存生物材料快速复温方法的研究进展[J]. 中国医学物理学杂志, 2015, 32(1):144-148.

- [19]于红梅, 胥义, 柳珂,等. 磁纳米粒子对 Vs55 溶液反玻璃化等温结晶行为的影响[J]. 化工学报, 2017, 68(3):1262-1268.
- [20]刘忠范. 氧化石墨烯控制冰晶生长并应用于低温细胞保存[J]. 物理化学学报, 2017, 33(2):263-263.
- [21]Geng H, Liu X, Shi G, et al. Graphene Oxide Restricts Growth and Recrystallization of Ice Crystals[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(4):997-1001.
- [22]华泽钊. 低温生物医学技术[M]. 科学出版社, 1994.
- [23]Zheng Y, Su C, Lu J, et al. Room-temperature ice growth on graphite seeded by nano-graphene oxide.[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52(33):8708.
- [24]徐海峰, 刘宝林, 高志新. 细胞及组织的玻璃化保存研究进展[J]. 低温工程, 2010(5):59-64. [25]Erickson K, Erni R, Lee Z, et al. Determination of the Local Chemical Structure of Graphene Oxide and Reduced Graphene Oxide[J]. *Advanced Materials*, 2010, 22(40):4467-4472.
- [25] Manuchehrabadi N, Gao Z, Zhang J, et al. Improved tissue cryopreservation using inductive heating of magnetic nanoparticles[J]. *Science Translational Medicine*, 2017, 9(379):eaah4586.
- [26] Dreyer D R, Park S, Bielawski C W, et al. The chemistry of graphene oxide.[J]. *Chemical Society Reviews*, 2009, 39(15):5288.
- [27] Mkhoyan K A, Contryman A W, Silcox J, et al. Atomic and Electronic Structure of Graphene-Oxide[J]. *Nano Letters*, 2009, 16(S2):1058-1063.
- [28] Erickson K, Erni R, Lee Z, et al. Determination of the Local Chemical Structure of Graphene Oxide and Reduced Graphene Oxide[J]. *Advanced Materials*, 2010, 22(40):4467-4472.
- [29] Whale T F, Rosillolopez M, Murray B J, et al. Ice Nucleation Properties of Oxidized Carbon Nanomaterials[J]. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 2015, 6(15):3012-3016.
- [30] Yang J, Shi G, Tu Y, et al. High correlation between oxidation loci on graphene oxide.[J]. *Angewandte Chemie*, 2014, 53(38):10190-4.
- [31] Szabó T, Tombácz E, Illés E, et al. Enhanced acidity and pH-dependent surface charge characterization of successively oxidized graphite oxides[J]. *Carbon*, 2006, 44(3):537-545.