

УДК 547.42:532.78:539.213

А.И. Осецкий

К теории диаграмм состояния криопротекторных растворов

UDC 547.42:532.78:539.213

A.I. Osetsky

To Theory of Diagrams of State for Cryoprotective Solutions

Реферат: Рассмотрены преимущества модели кластерной кристаллизации при описании фазовых переходов в криопротекторных растворах. Сформулированы принципы построения диаграмм состояния, содержащих области существования кластерной фазы. На основании этих диаграмм проведен анализ экспериментально наблюдаемых тепловых и объемных эффектов, сопровождающих процессы кристаллизации и плавления криопротекторных растворов. При этом особое внимание уделено различию фазовых траекторий, соответствующих охлаждению и последующему нагреву растворов, и введено понятие совмещенных диаграмм состояния для описания процессов, вызванных этим различием. С помощью модели кластерной кристаллизации определены равновесные структурные состояния замороженных криопротекторных растворов и возможные процессы, направленные на их достижение.

Ключевые слова: криопротекторный раствор, кластерная кристаллизация, диаграмма состояния, стеклование, структура.

Реферат: Розглянуто переваги моделі кластерної кристалізації при описі фазових переходів у криопротекторних розчинах. Сформульовано принципи побудови діаграм стану, які включають області існування кластерної фази. На основі цих діаграм проведено аналіз теплових і об'ємних ефектів, які супроводжують процеси кристалізації та плавлення криопротекторних розчинів. При цьому значну увагу приділено розрізненню фазових траєкторій, які відповідають охолодженню та подальшому нагріву розчинів, і введено поняття сумісних діаграм стану для опису викликаних цією різницею процесів. За допомогою моделі кластерної кристалізації визначено рівноважні структурні стани заморожених криопротекторних розчинів і можливі процеси, спрямовані на їхнє досягнення.

Ключові слова: криопротекторний розчин, кластерна кристалізація, діаграма стану, склування, структура.

Abstract: The paper considers the advantages of cluster crystallization model when describing phase transitions in cryoprotective solutions. The principles of plotting the diagrams of state are described, with emphasis on the fields of existing cluster phase. Basing on these diagrams the experimentally observed heat and volume effects are analyzed, which accompany the crystallization and melting of cryoprotective solutions. Herewith a special attention is paid to the distinguishing of phase curves, corresponding to cooling and following heating of the solutions and the definition of superposed diagrams of state was made to describe the processes caused by appearing differences. Model of cluster crystallization was used to determine the balanced structure state of frozen cryoprotective solutions and possible processes directed to their achieving.

Key words: cryoprotective solution, cluster crystallization, diagram of state, vitrification, structure.

1. Введение

Диаграммы состояния, описывающие фазовые траектории криопротекторных растворов в координатах «состав-температура», используются при создании новых и оптимизации существующих технологий криоконсервирования биообъектов. Однако следует отметить, что несмотря на большое количество работ в этой области [1, 3–6, 8, 11–15], до сих пор четко не классифицированы экспериментально получаемые диаграммы и, соответственно, не установлен их обобщенный тип в рамках геометрической термодинамики. Во многом это связано с особенностями кристаллизации криопротекторных растворов, обусловленными сложным характером взаимодействия молекул воды *A* с молекулами криопротекторного вещества *B*. Возни-

1. Introduction

Diagrams of state describing phase trajectories of cryoprotective solutions in the coordinates of 'composition vs. temperature' are used to develop new and optimize existing technologies used for cryopreservation of biological objects. However, it should be noted, despite of numerous reports in this field [1–4, 6, 9, 10, 12–15] there is no accurate classification of experimentally obtained diagrams yet and herewith these have no established generalized type within the framework of geometric thermodynamics. This is largely due to the peculiarities of crystallization of cryoprotective solutions stipulated by a complicated character of interaction between water molecules, *A*, and molecules of cryoprotective agent, *B*. Emerging hydrogen bonds between them have a wide energy range (1...10 kcal/mol)

Отдел низкотемпературного консервирования, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Адрес для корреспонденции:

ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015;
тел.: (+38 057) 373-40-80, факс: (+38 057) 373-30-84,
электронная почта: cryocon@rambler.ru

Поступила 25.01.2014

Принята в печать 14.02.2014

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2014. – Т. 24, №2. – С. 102–117.
© 2014 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Department of Low Temperature Preservation, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Address for correspondence:

23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;
tel.: +380 57 3734080, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: cryocon@rambler.ru

Received January 25, 2014

Accepted February 14, 2014

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2014. 24(2): 102–117.

© 2014 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

Основные обозначения

T	Температура
\dot{T}	Скорость изменения температуры
\dot{T}^-	Скорость охлаждения
\dot{T}^+	Скорость нагрева
T_0	Начальная температура охлаждаемого раствора
T_m	Температура плавления чистого компонента А или В
T_c	Температура кристаллизации чистого компонента А или В
T_g	Температура стеклования (расстеклования) высококонцентрированных жидких фракций
T_L^-	Температурные параметры линии ликвидуса при охлаждении раствора
T_L^+	Температурные параметры линии ликвидуса при нагреве замороженного раствора
T^{eut}	Температура эвтектики
C^{eut}	Эвтектическая концентрация
T_C^{eut}	Температура начала кластерной кристаллизации при охлаждении раствора
T_C^+	Температура окончания плавления кластеров при нагреве замороженного раствора
C_B	Весовая концентрация криопротекторного вещества В
C_0, C_C, C_g, C_1	Концентрационные параметры диаграмм состояния
A_s	Кристаллы льда
a_s	Нанокристаллы льда
b_s	Нанокристаллы вещества В в оболочке кластера
b_s^g	Аморфная фракция вещества В в оболочке кластера
B_s^g	Кристаллы криопротекторного вещества В
L	Жидкая фаза
β_c	Кластерная фаза
G	Твердая аморфная фракция
ΔG_{as}	Изменение свободной энергии раствора при образовании пространственных АВ-ассоциатов
ΔH_{as}	Изменение энтальпии раствора при образовании АВ-ассоциатов
ΔS_{as}	Изменение энтропии раствора при образовании АВ-ассоциатов
β_{ac}, β_{bc}	Кластерные частицы на основе нанокристаллов льда и криопротекторного вещества соответственно
ΔC_B	Изменение концентрации жидкой фазы при кластерной кристаллизации
ΔC_A	Изменение концентрации жидкой фазы при образовании кристаллов льда
ΔV_{ac}	Изменение объема системы при кластерной кристаллизации
ΔV_A	Изменение объема системы при образовании кристаллов льда
ΔV_{bc}	Изменение объема системы при образовании или плавлении кластерных оболочек
$\Delta Q_A, \Delta Q_{ac}$	Тепловые эффекты, сопровождающие образование кристаллов льда и кластерных частиц
$\langle \varepsilon_H \rangle$	Средняя энергия водородных связей А–В в комплексе $A_n B_m$
f	Число степеней свободы многофазной равновесной системы
r	Число находящихся в равновесии фаз
q	Число компонентов в системе (растворе)
R_d	Размерность диаграммы состояния
R_b	Размерность границ, разделяющих области существования фаз на диаграмме состояния
Φ^+, Φ^-	Число образующихся и исчезающих фаз при переходе через межфазную границу размерности R_b
r_{oc}	Размер критического зародыша льда, лежащего в основе образования кластерной частицы при температуре T_{co}
λ, ω	Концентрационные параметры невариантной горизонтали на диаграмме состояния
$(A_s + G)^-$	Фазовые композиции, характерные для охлаждаемых растворов
$(A_s + L + \beta_c)^+$	Фазовые композиции, характерные для отогреваемых растворов
$(B_s + L + \beta_{cb})^*$	Фазовые композиции, не наблюдаемые в используемых криопротекторных растворах

Main legends

T	Temperature
\dot{T}	Temperature change rate
\dot{T}^-	Cooling rate
\dot{T}^+	Heating rate
T_0	Initial temperature of solution to be cooled
T_m	Melting temperature of pure component either A or B
T_c	Crystallization temperature of pure component either A or B
T_g	Vitrification (devitrification) temperature of highly concentrated liquid fractions
T_L^-	Temperature parameters of liquidus line when cooling solution
T_L^+	Temperature parameters of liquidus line when heating frozen solution
T^{eut}	Eutectics temperature
C^{eut}	Eutectic concentration
T_C^{eut}	Temperature of cluster crystallization onset when cooling the solution
T_C^+	Temperature of ceasing the melting of clusters when heating
C_B	Mass concentration of cryoprotective substance B
C_0, C_C, C_g, C_1	Concentration parameters of diagram of states
A_s	Ice crystals
a_s	Ice nanocrystals
b_s	Nanocrystals of substance B in cluster covers
b_s^g	Amorphous fraction of substance in cluster covers
B_s^g	Crystals of cryoprotective substances B
L	Liquid phase
β_c	Cluster phase
G	Solid amorphous fraction
ΔG_{as}	Change of solution free energy when forming spatial AB-associates
ΔH_{as}	Change of solution enthalpy when forming spatial AB-associates
ΔS_{as}	Change of solution entropy when forming spatial AB-associates
β_{ac}, β_{bc}	Cluster particles based on nanocrystals of ice and cryoprotective substance, respectively
ΔC_B	Change of liquid phase concentration during cluster crystallization
ΔC_A	Change of liquid phase concentration during ice crystal formation
ΔV_{ac}	Change of system volume during cluster crystallization
ΔV_A	Change of system volume during ice crystal formation
ΔV_{bc}	Change of system volume during formation or melting of cluster membranes
$\Delta Q_A, \Delta Q_{ac}$	Heating effect accompanying formation of ice crystals and cluster particles
$\langle \varepsilon_H \rangle$	Average energy of hydrogen A–B bonds in associate $A_n B_m$
f	Number of degrees of freedom in multiphase system in equilibrium state
r	Number of phases in equilibrium
q	Number of components in system (solution)
R_d	Dimensionality of phase diagram
Φ^+, Φ^-	Number of forming and disappearing phase when transiting interphase boundary of dimension R_b
r_{oc}	Size of ice critical nucleus being in the base of cluster particle formation at temperature T_{co}
λ, ω	Concentration parameters of nonvariant horizontal in diagram of state
$(A_s + G)^-$	Phase compositions characteristic for cooled solutions
$(A_s + L + \beta_c)^+$	Phase compositions characteristic for heated solutions
$(B_s + L + \beta_{cb})^*$	Phase compositions not observed in the used cryoprotective solutions



кающие между ними водородные связи имеют широкий энергетический диапазон (1...10 ккал/моль) и могут существенно отличаться по величине даже в пределах одного комплекса A_nB_m , где n и m – количество молекул воды и криопротекторного вещества в комплексе. В результате слабо связанные молекулы могут участвовать в образовании отдельных кристаллов льда A_s или криопротекторного вещества B_s . В то же время сильно связанные фрагменты комплексов A_nB_m при охлаждении раствора не диссоциируют и переходят в твердофазное состояние в виде аморфной фракции G [5, 6] или второй твердой фазы [3, 11, 13]. Характерно, что эта фаза, как правило, образуется не при охлаждении криопротекторного раствора, а при его последующем нагреве выше температуры расстеклования T_g [1, 4, 13–15]. Данный факт противоречит классическим представлениям о процессах кристаллизации водных растворов и крайне затрудняет выяснение как природы этой фазы, так и принципов ее отображения на диаграммах состояния. Фактически изучение особенностей образования второй фазы в данном случае затрагивает не только сугубо криобиологические вопросы, связанные с обеспечением сохранности замораживаемых биообъектов, но и определенные разделы теории фазовых превращений. Последнее обусловлено тем, что ранее процесс образования подобных фаз в системах с межмолекулярным взаимодействием компонентов, которое приводит к образованию комплексов, не диссоциирующих в процессе кристаллизации раствора, детально не изучался.

В связи с вышеизложенным в работе был проведен анализ термодинамических аспектов возникновения второй твердой фазы в криопротекторных растворах при их охлаждении и последующем нагреве, а также принципов отображения областей ее существования на соответствующих диаграммах состояния (фазовых диаграммах).

Установленный тип диаграмм может использоваться для объяснения экспериментально наблюдаемых закономерностей кристаллизации-плавления наиболее востребованных в криобиологии криопротекторных растворов.

2. Особенности изображения кластерной фазы на диаграммах состояния двухкомпонентных систем

Известно, что большинство криопротекторных веществ полностью растворимы в воде, а кристаллы льда практически не содержат примесных атомов или молекул. Этот факт является веским основанием для описания диаграммами состояния

and can significantly differ in size even within the range of one complex A_nB_m , where n and m are the numbers of water molecules and cryoprotective agent in the associate. As a result, loosely bound molecules may participate in formation of single crystals of ice A_s or cryoprotective agent B_s . However, strongly bound fragments of A_nB_m associates during cooling of solution do not dissociate and transit into a solid state as an amorphous fraction G [2, 3] or the second solid state [1, 9, 12]. Specifically, this phase is usually not formed during cooling of cryoprotective solution, but when further heating up to devitrification temperature T_g [2, 12–15]. This fact contradicts the common ideas on the crystallization of aqueous solutions and extremely complicates revealing the nature of this phase as well as the principles of its visualization in diagrams of state. In fact, the study of peculiarities of the second phase formation in this case affects not only very cryobiological issues associated with providing preservation of frozen biological objects, but also certain parts of theory of phase transitions. The latter is stipulated by the fact that to the moment there are no detailed studies on formation of these phases in systems with intermolecular interactions between components, resulting in a formation of associates, which do not dissociate during crystallization of solution.

In view of the aforesaid this study deals with analysis of thermodynamic aspects which underlie the appearance of the second solid state in cryoprotective solutions during their cooling and following heating as well as principles of visualizing the ranges of its existence in the corresponding diagrams of state (phase diagrams).

The type of diagrams set may be used to explain experimentally observed regularities of crystallization, *i.e.* melting of the most applicable cryoprotective solutions in cryobiology.

2. Features of visualization of cluster phase in diagrams of state for two-component systems

It is known that most of cryoprotective substances completely dissolve in water, and ice crystals are almost free of foreign atoms or molecules. This fact is strong case to apply phase diagrams of an eutectic type for describing the crystallization of both saline and aqueous solutions of cryoprotective agents [1, 6, 12, 14]. It is also believed that these diagrams are also suitable to describe the formation of crystal hydrates as intermediate phases ($a_k b_l$) in aqueous solutions of cryoprotective agents. Here the parameters k and l denote the ratio of water molecules A and cryoprotective agent B in elementary unit of a crystal hydrate. In this case a whole diagram is divided into two or more unified eutectic diagrams, and eutectic crystallization



эвтектического типа процессов кристаллизации не только солевых растворов, но и водных растворов криопротекторных веществ [1, 3, 8, 13]. Считается также, что эти диаграммы пригодны и для описания процессов образования кристаллогидратов как промежуточных фаз ($a_k b_l$)_s в водных растворах криопротекторных веществ. Здесь параметры k и l определяют соотношение молекул воды A и криопротекторного вещества B в элементарной ячейке кристаллогидрата. В этом случае общая диаграмма распадается на две или более слитные эвтектические диаграммы, а под эвтектической кристаллизацией подразумевается переход жидкой фазы в смесь микрокристаллов льда a_s или микрокристаллов криопротекторного вещества b_s с кристаллогидратами строго определенного состава ($a_k b_l$)_s [13].

Однако при детальном анализе процессов кристаллизации и последующего плавления реальных криопротекторных растворов возникает ряд противоречий между экспериментальными данными и закономерностями эвтектической кристаллизации. Прежде всего, при экспериментальном изучении кинетики кристаллизации водных растворов на основе глицерина, диметилсульфоксида, этиленгликоля, полиэтиленоксида и целого ряда других криопротекторных веществ не удается четко зафиксировать не только эвтектическую концентрацию C_{eut} , но и температуру образования эвтектики при охлаждении T_{eut} . Фактически эта температура при концентрациях криопротекторного раствора $C_B < C'_{eut}$ (C'_{eut} – предполагаемая эвтектическая концентрация) должна определяться по моменту кристаллизации второй твердой фазы. Однако в реальных системах процесс образования этой фазы наблюдается не при конкретных значениях температуры $T = T'_{eut}$ и концентрации раствора $C_B = C'_{eut}$, а в широких температурных и концентрационных интервалах. Кроме того, в большинстве случаев процесс образования второй фазы вообще не наблюдается при охлаждении, а ее образование и последующее плавление фиксируются двумя отдельными пиками на термограммах при последующем отогреве. При этом как величина площади под тепловыми пиками, так и расстояние между ними абсолютно не соответствуют эвтектическим закономерностям. Так, например, площадь под первым эндотермическим пиком, который обычно трактуется как пик плавления «эвтектики», резко уменьшается при условии $C_B \rightarrow C'_{eut}$ [1, 4, 13, 14], что явно противоречит канонам эвтектической кристаллизации. Не соответствует положениям теории фазовых превращений и тот экспериментальный факт, что при достижении температуры

is supposed as the transition of liquid phase in the mixture of ice microcrystals a_s or the cryoprotective agent microcrystals b_s with crystal hydrates of strongly determined composition ($a_k b_l$)_s [12].

However, the detailed analysis of crystallization and following melting of real cryoprotective solutions reveals some contradictions between experimental data and regularities of eutectic crystallization. First of all, experimental study of crystallization kinetics in aqueous solutions of glycerol, dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, polyethylene oxide and the range of other cryoprotective agents do not allow to precisely locate either eutectic concentration, C_{eut} or temperature when an eutectics forms during cooling, T_{eut} . Actually, if concentrations of cryoprotective solution are $C_B < C'_{eut}$ (C'_{eut} is estimated eutectic concentration) this temperature could be determined by the point of crystallization of the second solid state. However, in real systems this phase is formed within wide temperature range and concentration intervals rather than at certain values of temperature $T = T'_{eut}$ and concentration of solution $C_B = C'_{eut}$. In addition, most cases do not show the appearance of the second phase during cooling, and its appearance and following melting are visualized by two separate peaks in thermograms only during following heating. Herewith, both value of area under thermal peaks and the distance between them are fully not consistent with the eutectic regularities. For example, the area under the first endothermic peak usually interpreted as peak of 'eutectics' melting decreases dramatically if $C_B \rightarrow C'_{eut}$ [3, 12–14], that obviously contradicts the canons of eutectic crystallization. No consistence with the regulations of theory of phase transitions one could find with the fact that when reaching the temperature T'_{eut} , conventionally denoted as eutectic one in the diagrams of state, the cooled cryoprotectants are not crystallized entirely. The remaining liquid fractions transit into solid amorphous state only at more lower temperatures $T_g < T'_{eut}$ [3, 4, 14, 15].

It is also quite hard to explain a supposed precipitation of eutectics, being a mechanical mixture of single ice crystals a_s , cryoprotective agent b_s and crystal hydrates ($a_k b_l$)_s [12]. This process requires a sufficient number of free molecules of water and cryoprotective substance in a solution. However, the concentrations C'_{eut} in the diagrams denote a liquid phase solely of strongly bound associates $A_n B_m$. Appearance of pure crystals a_s or b_s in this solution could be possible if substance B would lose its cryoprotective properties stipulated by H-bonds, *i. e.* the following conditions could be fulfilled: $\langle \epsilon_H \rangle \rightarrow 0$ at $T \rightarrow T'_{eut}$ where $\langle \epsilon_H \rangle$ is the average energy of H-bonds in the associate. Another case of this transition requires a

T'_{eut} , которая условно обозначается на диаграммах состояния как эвтектическая, охлаждаемые криопротекторные растворы не кристаллизуются полностью. Остающиеся жидкие фракции переходят в твердое аморфное состояние при более низких температурах $T_g < T'_{eut}$ [1, 5, 6, 15].

Достаточно сложным для объяснения является и предполагаемый процесс выпадения эвтектик, состоящих из механической смеси отдельных кристаллов льда a_s , криопротекторного вещества b_s и кристаллогидратов $(a_k b_l)_s$ [13]. Для реализации этого процесса в растворе должно находиться достаточное количество свободных молекул воды и криопротекторного вещества. Однако обозначаемым на диаграммах концентрациям C_{eut} соответствует жидкая фаза, состоящая исключительно из сильно связанных комплексов $A_n B_m$. Для возникновения в таком растворе отдельных кристаллов a_s или b_s вещество B должно терять свои криопротекторные свойства, обусловленные Н-связями, т. е. необходимо выполнение условия $\langle \epsilon_H \rangle \rightarrow 0$ при $T \rightarrow T'_{eut}$, где $\langle \epsilon_H \rangle$ – средняя энергия Н-связей в ассоциате. Другой вариант такого перехода требует резкого повышения вероятности флуктуационных разрывов Н-связей при $T \rightarrow T'_{eut}$. Очевидно, что оба условия противоречат физическому смыслу.

Особенно проблематично использование термина «эвтектическая кристаллизация» для систем, в которых один из компонентов при реально используемых режимах охлаждения-отогрева не кристаллизуется вообще, например для водно-глицериновых растворов.

Очень спорным представляется описание кристаллизации криопротекторных растворов набором слитных эвтектических диаграмм, в которых промежуточными фазами выступают кристаллогидраты. Такими фазами могут являться только кристаллогидраты строго постоянного состава с регулярной кристаллической решеткой, которые образуются как в процессе предварительного охлаждения, ниже линии ликвидуса, так и при эвтектическом переходе жидкой фазы в смесь кристаллов льда a_s и кристаллогидратов $(a_k b_l)_s$. Однако регулярные кристаллические решетки на основе молекул воды и перечисленных криопротекторных веществ до настоящего времени не обнаружены. Особенно сложно представить образование таких решеток в условиях, при которых в охлаждаемом растворе вследствие роста кристаллов A_s или B_s постоянно изменяется соотношение молекул A и B . В таком случае необходимо постулировать возможность существования вдоль оси концентраций C_B набора кристаллогидратов разного состава [13]. В то же время смоделировать соответствующие этому предположению регулярные кристалличес-

sharp increase of probability of fluctuation breaks in H-bonds at $T \rightarrow T'_{eut}$. Both conditions apparently have no physical sense.

Using the term ‘eutectic crystallization’ is especially questionable for systems wherein one of the components do not crystallize at all under the used regimens of freeze-thawing, for instance, aqueous-glycerol solutions.

Quite controversial is also the visualization of crystallization of cryoprotective solutions by the set of superposed eutectic diagrams where crystal hydrates serve as intermediate phases. These phases may be only the crystal hydrates of strictly constant composition with regular lattice formed both during precooling below liquidus line and during eutectic transition of liquid state into the mixture of ice crystals a_s and crystal hydrates $(a_k b_l)_s$. However, no regular lattices based on water molecules and mentioned cryoprotective agents have been revealed so far. It is hard to imagine the formation of these lattices under conditions when the ratio of molecules A and B constantly change in a cooled solution due to the growth of crystals A_s or B_s . In this case one has to postulate the possible existence of set of crystal hydrates of different composition along the concentration axis C_B [12]. At the same time, it is impossible to model regular lattices corresponding to this assumption. Such an inconsistency of experimental data and parameters of eutectic crystallization rise the issue concerning the nature of the second phase in aqueous solutions of cryoprotective agents and peculiarities of its visualization in diagrams of state.

As one of the possible answers to this question is previously investigated probability of formation of microcrystals a_s and b_s without breaks in hydrogen bonds in associates $A_n B_m$ [8–10]. In particular, for crystals a_s during cooling of cryoprotective solution such a possibility appears at $T \leq T_C$ (Fig. 1) [9, 10] when of ice crystal nuclei acquire such a critical size whereby they can form the clusters without breaks of A – B bonds due to combination of $A_n B_m$ associates. Herewith, the number of water molecules in the forming cluster should be consistent with the condition of critical nucleus within the specific temperature interval [11]. Naturally, in this case the aggregates are primarily replenished by the associates with maximum amount of bound water, and then by less hydrated molecules as temperature decreases. This means that cluster crystallization is implemented within quite a wide temperature range $T_C \dots T_g$ that is totally different to cluster crystallization, occurring at constant temperature $T = T'_{eut}$. The model of cluster particle formed of water molecules A and cryoprotective agent B without break in existing between them H-bonds is presented in Fig. 2.

Typical structure of the forming particles of cluster phase β_c is schematically shown in Fig. 3. The forming



кие решетки практически невозможно. В результате такого несоответствия между экспериментальными результатами и параметрами эвтектической кристаллизации возникает вопрос относительно природы второй твердой фазы в водных растворах криопротекторных веществ и особенностей ее отображения на диаграммах состояния.

Как один из вариантов ответа на этот вопрос ранее была рассмотрена вероятность образования микрокристаллов a_s и b_s без разрыва водородных связей в комплексах $A_n B_m$ [10–12]. В частности, для кристаллов a_s такая возможность в процессе охлаждения криопротекторного раствора возникает при температурах $T \leq T_c$ (рис. 1) [11, 12], когда критические зародыши кристаллов льда достигают таких размеров, при которых они могут образовываться вследствие соединения комплексов $A_n B_m$ в кластеры без разрыва связей $A-B$. При этом необходимо, чтобы количество молекул воды, находящихся в образуемом кластере, соответствовало условию для критического зародыша в конкретном температурном интервале [2]. Естественно, что в этом случае в агрегаты сначала переходят комплексы с максимальным количеством связанной воды, а по мере понижения температуры менее гидратированные молекулы. Это означает, что кластерная кристаллизация реализуется в достаточно широком диапазоне температур $T_c \dots T_g$, что принципиально отличает ее от эвтектической кристаллизации, протекающей при постоянной температуре $T = T_{eut}$. Модель кластерной частицы, образованной из молекул воды A и криопротекторного вещества B без разрыва существующих между ними Н-связей, показана на рис. 2.

Типичная структура образующихся частиц кластерной фазы β_c схематически показана на рис. 3.

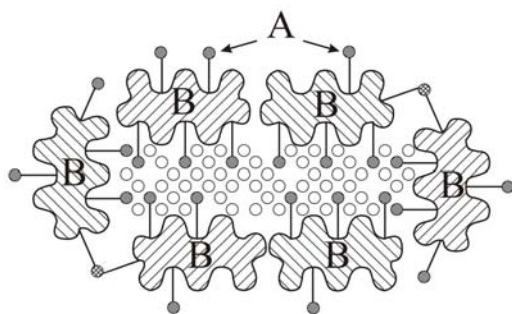


Рис. 2. Модель поперечного сечения кластера, образованного из 28 комплексов $A_n B$ и содержащего 150 молекул воды A в составе микрокристалла льда a_s . Не заштрихованы связанные молекулы воды, лежащие вне плоскости сечения.

Fig. 2. Model of cross-section of a cluster formed of 28 $A_n B$ complexes and containing 150 water molecules A as a component of ice microcrystals a_s . Bound water molecules being beyond section plane are unshaded.

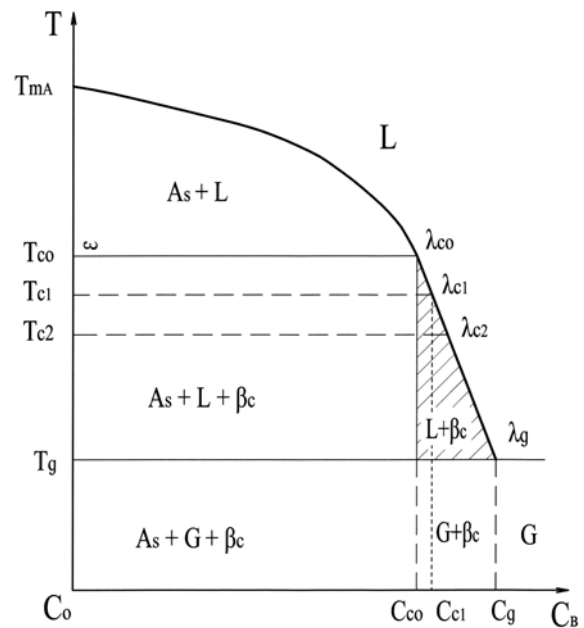


Рис. 1. Фрагмент диаграммы состояния, включающей область существования кластерной фазы β_c и соответствующей условию $T_c^- > T_g$, где T_c^- – линия ликвидуса фазы β_c при охлаждении раствора.

Fig. 1. Fragment of diagram of state which includes the areas of cluster phase, β_c , existence and meeting the condition $T_c^- > T_g$, where T_c^- is the liquidus line of phase β_c during cooling the solution.

clusters are not crystal hydrates which possess a tight ratio of water molecules and cryoprotective agent as well as strictly regular distribution of spatial crystalline lattice. Furthermore, this approach admits the formation of cluster particles of two types: with amorphous (Fig. 3A) or crystalline (Fig. 3B) membranes of cryoprotective agent molecules. However, the principles of plotting such phase diagrams with cluster phase being the particles with stated structure require a careful analysis based on the regularities of geometric thermodynamics.

To begin with, these diagrams must meet the main conditions resulting from Gibbs phase rule [11].

The first condition is the variance of system (the number of its degree of freedom) f at constant pressure:

$$f = q - r + 1, \quad (1)$$

where q is the number of components, r – number of equilibrium phases.

The second condition is the dimensionality of boundaries between the phases in equilibrium:

$$R_b = R_d - \Phi^+ - \Phi^-, \quad (2)$$

where R_b is the dimensionality of the boundary; R_d is the dimensionality of diagram; Φ^+ and Φ^- are the

Образующиеся кластеры не являются кристаллогидратами, которые характеризуются заданным соотношением молекул воды и криопротекторного вещества, а также их строго регулярным расположением в пространственной кристаллической решетке. Более того, данный подход допускает образование кластерных частиц двух типов: с аморфной (рис. 3, А) или кристаллической (рис. 3, В) оболочками из молекул криопротекторного вещества. Однако принципы построения диаграмм состояния, содержащих кластерную фазу в виде частиц с такой структурой, требует очень тщательного анализа на основе закономерностей геометрической термодинамики.

В первую очередь, такие диаграммы должны удовлетворять основным условиям, вытекающим из правила фаз Гиббса [2].

Первое условие – вариантность системы (число ее степеней свободы) f при постоянном давлении:

$$f = q - r + 1, \quad (1)$$

где q – число компонентов, r – число равновесных фаз.

Второе условие – размерность границ между находящимися в равновесии фазами:

$$R_b = R_d - \Phi^+ - \Phi^-, \quad (2)$$

где R_b – размерность границы; R_d – размерность диаграммы; Φ^+ и Φ^- – число образующихся и исчезающих фаз при переходе через межфазную границу соответственно.

Анализ показывает, что фрагмент такой диаграммы может иметь вид, представленный на рис. 1. Данная диаграмма описывает следующие особенности кластерной кристаллизации:

- кластеры β_c образуются в широком диапазоне температур $T_{c0} \dots T_g$, а не при $T = T_{eut} = const$, как этого требует эвтектическая кристаллизация;

- существуют концентрационные интервалы $C_B > C_{c0}$, в которых не образуются отдельные кристаллы льда или криопротекторного вещества, что обязательно в диаграммах эвтектического типа вдоль всей оси концентраций C_B ;

- структура кластеров принципиально отличается от структуры кристаллогидратов, для которых характерны регулярные кристаллические решетки из молекул A и B ;

- при исходных концентрациях водного раствора $C_B < C_g$ кластер состоит из кристаллического ядра a_s , окруженного молекулами B , создающими межфазную границу, которая может находиться как в аморфном, так и в кристаллическом состоянии;

number of forming and disappearing phases when transiting interphase boundary, respectively.

The analysis shows the appearance of fragment of such diagram as in Fig. 1. The presented diagram could describe the following peculiarities of cluster crystallization:

- clusters β_c are formed within the wide temperature range $T_{c0} \dots T_g$ rather than $T = T_{eut} = const$ as is required during eutectic crystallization;

- there are the concentration ranges $C_B > C_{c0}$ wherein no single crystals of ice or cryoprotective agent are formed, that is mandatory in eutectic diagrams along the whole axis of concentrations C_B ;

- structure of the cluster principally differs from the structure of crystal hydrates with regular lattices of molecules A and B ;

- in case of initial concentrations $C_B < C_g$ the cluster consists of crystalline nucleus a_s surrounded by molecules B creating interphase boundary which may be both in amorphous and crystal state;

- temperature decrease is accompanied with changes in cluster phase composition changes, as less and less hydrated molecules start to take part in cluster formation, so the ratio of molecules A and B is not constant.

The last peculiarity of cluster crystallization eliminates apparent disconformity with the condition of variance (1) which could be found in diagram shown in Fig. 1. According to this condition a three-phase binary system is non-variant. Its geometric appearance in diagram of state consists of three superposed figurative points on horizontal line $T = T(C_B) = const$ corresponding to composition of phases being at this temperature in equilibrium with each other. Typical example of this non-variant system is an eutectic horizontal $T_{eut} = const$ describing the equilibrium of phases A_s , B_s and L . While

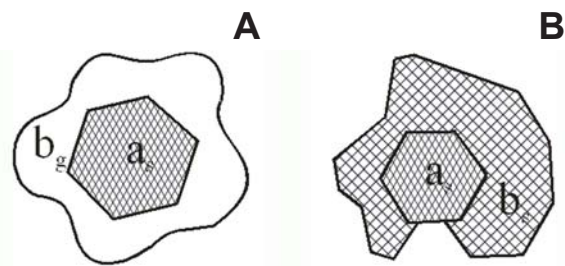


Рис. 3. Схематическое изображение кластерных частиц, включающих ядра из микрокристаллов льда a_s и оболочки из молекул криопротекторного вещества, находящиеся в аморфном b_g (А) и кристаллическом b_s (В) состояниях.

Fig. 3. Schematic image of cluster particles including the nuclei of ice microcrystals a_s and cover of cryoprotective substance molecules being in amorphous b_g (A) and crystalline b_s (B) states.



– с понижением температуры изменяется состав кластерной фазы, так как в образовании кластеров принимают участие все менее гидратированные молекулы, и соотношение молекул A и B в кластере не является постоянным.

Последняя особенность кластерной кристаллизации устраняет кажущееся несоответствие условию вариантности (1), представленной на рис. 1 диаграммы. Согласно этому условию, трехфазная бинарная система нонвариантна. Ее геометрический образ на диаграмме состояний – три сопряженные фигуративные точки на горизонтальной линии $T = T(C_B) = const$, которые соответствуют составу фаз, находящихся при данной температуре в равновесии друг с другом. Типичным примером такой нонвариантной системы является эвтектическая горизонталь $T_{eut} = const$, описывающая равновесие фаз A_s , B_s и L . Поскольку составы этих фаз строго определены, то их равновесие не может больше реализоваться ни при какой другой температуре.

Принципиально иная ситуация наблюдается в случае кластерной кристаллизации. Ее начало при охлаждении раствора описывает горизонталь $T_{c0} = const$ (см. рис. 1). Здесь точка ω соответствует кристаллической фазе A_s , точка λ_{c0} представляет собой слившиеся фигуративные точки жидкой L и кластерной β_c фаз, состав которых определяется концентрацией C_{c0} и размером r_{0c} критического зародыша льда при температуре T_{c0} . С дальнейшим понижением температуры, например от T_{c0} до T_{c1} , размер критического зародыша льда внутри кластерной частицы уменьшается от r_{0c} до r_{1c} . Это приведет к изменению соотношения числа молекул A и B в кластерных частицах, т. е. к вариациям состава кластерной фазы. Поэтому при температуре T_{c1} в равновесии с кристаллами льда A_s в точке λ_{c1} будут находиться фазы L и β_c другого состава, соответствующего концентрации C_{c1} . Это отражено на рис. 1 равновесной горизонталью $T_{c1} = const$.

Аналогичные горизонталь $T_{c2} = const$ и $T_{cg} = T_g = const$ отражают трехфазные равновесные состояния при дальнейшем понижении температуры. Таким образом, в отличие от эвтектической кристаллизации, у системы с кластерной фазой появляется дополнительная переменная – состав фазы β_c , которая увеличивает число степеней свободы трехфазной бинарной системы. В результате равновесные состояния фаз A_s , L и β_c в интервале температур $T_{c0} \dots T_g$ соответствуют линии $\lambda_{c0} - \lambda_g$ (см. рис. 1). Следует отметить, что составы фаз L и β_c изменяются коррелированно, поэтому число степеней свободы в двухфазной системе $L + \beta_c$ удовлетворяет классическому условию (1) (см. рис. 1).

composition of these phase is strictly determined, their equilibrium could not be implemented at any other temperature.

Principally different situation is observed in case of cluster crystallization. Its onset during cooling of solution is described by a horizontal $T_{c0} = const$ (Fig. 1). Here the point ω corresponds to a crystal phase A_s , λ_{c0} represents the superposed figurative points of liquid L and cluster β_c phase, which composition is determined by concentration C_{c0} and size r_{0c} of critical ice nucleus at temperature T_{c0} . The following fall of temperature, e. g. T_{c0} down to T_{c1} , is accompanied with a decrease of the size of critical ice nucleus inside the cluster particle from r_{0c} down to r_{1c} . This causes the change in ratio between A and B molecules number in cluster particles, i. e. variations in composition of cluster phase. Thus, at the temperature of T_{c1} the ice crystals A_s in the point λ_{c1} would be in an equilibrium with the phases L and β_c of another composition corresponding to concentration C_{c1} . Fig. 1 represents this as a horizontal $T_{c1} = const$.

Similar horizontals $T_{c2} = const$ and $T_{cg} = T_g = const$ reflect three-phase equilibrium states during following temperature decrease. Thus, unlike eutectic crystallization a system with cluster phase has an additional variable, i. e. the composition of phase β_c which increases the number of degrees of freedom in three-phase binary system. As a result the equilibrium states of phases A_s , L and β_c within the temperature range $T_{c0} \dots T_g$ correspond to the curve $\lambda_{c0} - \lambda_g$ (Fig. 1). It should be noted that compositions of phases L and β_c change correlatively, so the number of degrees of freedom in two-phase system $L + \beta_c$ meets a classical condition (1) (see Fig. 1).

3. Description of cooling-heating processes for cryoprotective solutions with superposed state diagrams

According to the experimental data [1, 2, 4, 12–15], the second solid phase β_c in cryoprotective solutions with an initial concentration $C_B < C_g$ in most cases is formed not during cooling of solution, but during its following heating from the temperature of amorphous fractions devitrification. This enables suggesting the phase β_c to be formed in two stages. At the first stage the spatial associates of hydrated molecules of a cryoprotective agent appear in the solution during cooling, and the single fragments of them are involved into formation of the cluster phase particles at the second stage. In this case one should consider the fact of a decrease in the system entropy by ΔS_{as} as a result of associate formation and solution structurization. If the value ΔS_{as} is essential, the first phase implementation is only possible at low temperatures $T < T_{as}$, when $T_{as} \Delta S_{as}$ summand meets the following condition:



3. Описание процессов охлаждения-отогрева криопротекторных растворов совмещенными диаграммами состояний

Согласно экспериментальным данным [1, 3, 4, 6, 13–15] вторая твердая фаза β_c в криопротекторных растворах с исходной концентрацией $C_B < C_g$ в большинстве случаев образуется не при охлаждении раствора, а при его последующем отогреве от температуры расстеклования аморфных фракций. Это позволяет предположить, что фаза β_c образуется в два этапа. На первом этапе в охлаждаемом растворе возникают пространственные ассоциаты гидратированных молекул криопротекторного вещества, из отдельных фрагментов которых образуются частицы кластерной фазы на втором этапе. При этом необходимо учитывать, что в результате образования ассоциатов и структурирования раствора уменьшается энтропия системы на ΔS_{as} . Если величина ΔS_{as} существенна, то реализация первого этапа возможна только при низких температурах $T < T_{as}$, когда слагаемое $T_{as} \Delta S_{as}$ удовлетворяет следующему условию:

$$\Delta G_{as} = \Delta H_{as} - T_{as} \Delta S_{as} < 0, \quad (3)$$

где ΔG_{as} – изменение свободной энергии системы при образовании ассоциатов; T_{as} – температура начала процессов ассоциации при охлаждении раствора.

Очевидно, что в растворах с $T_{as} \approx T_g$ реализация второго этапа при охлаждении маловероятна в силу резкого повышения вязкости жидких фракций в процессе стеклования. Однако при последующем нагреве выше T_g , по мере увеличения тепловой подвижности молекул в образовавшихся при охлаждении ассоциатах, сворачивание этих ассоциатов или их фрагментов в кластеры β_c -фазы может происходить достаточно активно.

Естественно, что в данной ситуации диаграммы состояния, описывающие охлаждение и последующий нагрев, раствора будут иметь разный вид. Так, например, типичный вид диаграммы, описывающей поведение охлаждаемых двухкомпонентных водных растворов криопротекторных веществ с исходной концентрацией $C_B < C_g$, показан на рис. 4. В то же время, если при последующем отогреве этих растворов в них протекает кластерная кристаллизация, их фазовые состояния соответствуют диаграмме, представленной на рис. 1. Фактически нагрев предварительно охлажденного ниже температуры T_g раствора сопровождается переходом от диаграммы, представленной на рис. 4, к диаграмме, приведенной на рис. 1. Анализ протекающих при этом процессов удобно проводить, наложив данные

$$\Delta G_{as} = \Delta H_{as} - T_{as} \Delta S_{as} < 0, \quad (3)$$

where ΔG_{as} is a change in the system free energy during formation of associates; T_{as} is the temperature of onset of association processes during cooling of the solution.

It is evident that in the solutions with $T_{as} \approx T_g$ the implementation of the second stage during cooling is slightly probable due to a sharp increase in the viscosity of liquid fractions during vitrification. However, during subsequent heating above T_g , with a rise of thermal mobility of molecules in the associates, formed during cooling, the folding of these associates or their fragments into β_c phase clusters may occur quite actively.

Of course, the state diagrams describing the cooling and subsequent heating of the solution would appear differently in this situation. For example, Fig. 4 shows a typical appearance of diagram that describes the behaviour of cooled two-component aqueous solutions of cryoprotective agents with an initial concentration of $C_B < C_g$. Meanwhile, if during the subsequent heating of these solutions the cluster crystallization occurs, their phase states correspond to the diagram shown in Fig. 1. Actually, the heating of the solution, previously cooled below temperature T_g is accompa-

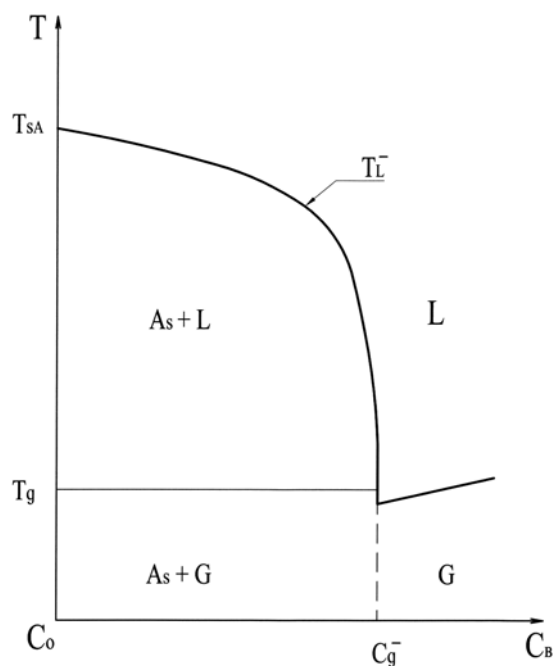


Рис. 4. Фрагмент диаграммы состояния, описывающей охлаждение криопротекторного раствора при условии $T_C^- \approx T_g$ в интервале концентраций криопротекторного вещества $C_0 \dots C_g^-$.

Fig. 4. Fragment of diagram of state describing cooling of cryoprotective solution under the condition $T_C^- \approx T_g$ within the range of cryoprotective substance concentration $C_0 \dots C_g^-$.



диаграммы друг на друга, как это сделано на рис. 5. Рассмотрим фрагменты таких совмещенных диаграмм состояния в интервале концентраций $C_0 \dots C_g^+$ подробнее. Согласно представленной на рис. 5, А схеме, при охлаждении раствора с исходной концентрацией C_B' в нем при температуре T_{L1}^- начинается образование кристаллов льда A_s , которое заканчивается при достижении температуры стеклования T_g и концентрации C_g^- . В случае последующего нагрева этого раствора с той же абсолютной скоростью изменения температуры ему будет соответствовать диаграмма состояния, построенная по точкам T_L^+ и T_C^+ (рис. 5, А, пунктирные линии). Поэтому траектория отогрева раствора, изображенная в координатах $T(C_B)$, будет отклоняться от диаграммы T_L^- и приближаться к диаграмме T_L^+ . Такая траектория для раствора C_B' изображена на рис. 5, А отдельными стрелками, направленными в сторону повышения температуры, и отмечена цифрой 1. Согласно этой траектории в интервале температур $T_g \dots T_C^+$ в растворе будут формироваться и затем плавиться частицы кластерной фазы β_c . Образование максимального количества кластерной фазы β_c при этом соответствует отклонению концентрации жидкой фазы от значения C_g^- на $\Delta C_B'$. Это отклонение вызывает соответствующие объемные $\Delta V'_{ac}$ и тепловые Q'_{ac} эффекты, которые отражаются на экспериментально получаемых дилато- или термограммах [1, 4, 11, 13–15]. Фактически отогрев такого раствора приводит к появлению трехфазной системы $(A_s + L + \beta_c)^+$, область существования которой на диаграммах на рис. 5 отмечена штриховкой. При прохождении через эту область отогреваемого раствора с начальной концентрацией $C_B < C_g^-$ в нем может образовываться не только кластерная фаза, но и дополнительная масса кристаллов льда A_s . Такое явление может возникать при условии $\dot{T}^- \gg \dot{T}^+$ и его вероятность существенно повышается при длительных временных остановках в области температур $T_g \dots T_C^+$. Соответствующие этому процессу эффекты описали ранее V.L. Bronsteyn и P.L. Steponkus [7].

В свою очередь охлаждение раствора с начальной концентрацией C_B'' , (рис. 5, В) приводит к его полному стеклованию при температуре T_g без каких-либо промежуточных фазовых переходов. Последующему нагреву этого раствора соответствует траектория 2, согласно которой в нем происходит кластерная кристаллизация, сопровождающаяся максимальным отклонением концентрации раствора от исходного значения C_B'' на $\Delta C_B''$. Температура, при которой фиксируется это отклонение, соответствует максимуму экзотермических

низили переходом от диаграммы, показанной на рис. 4 к той, что представлена на рис. 1. Удобно анализировать процессы, происходящие при этом, подгоняя эти диаграммы, как на рис. 5. Давайте рассмотрим в деталях фрагменты таких наложенных диаграмм состояния в пределах концентрационного диапазона $C_0 \dots C_g^+$. Согласно диаграмме, представленной на рис. 5А, охлаждение раствора с начальной концентрацией C_B' сопровождается образованием кристаллов льда A_s с температуры T_{L1}^- и заканчивается при достижении температуры стеклования T_g и концентрации C_g^- . В случае последующего нагрева этого раствора с той же абсолютной скоростью изменения температуры он будет соответствовать диаграмме состояния, построенной через точки T_L^+ и T_C^+ (рис. 5А, пунктирные линии). Поэтому кривая нагрева раствора, изображенная в координатах T vs. C_B , будет отклоняться от диаграммы T_L^- и приближаться к диаграмме T_L^+ . Такая кривая для раствора C_B' изображена на рис. 5А отдельными стрелками, направленными в сторону повышения температуры, и отмечена цифрой 1. Согласно этому пути, в температурном диапазоне $T_g \dots T_C^+$ в растворе будут образовываться и затем плавиться частицы кластерной фазы β_c . Образование максимального количества кластерной фазы β_c соответствует здесь отклонению концентрации жидкой фазы от значения C_g^- на $\Delta C_B'$. Это отклонение вызывает соответствующие объемные $\Delta V'_{ac}$ и тепловые Q'_{ac} эффекты, которые отражены на экспериментально полученных дилато- или термограммах [2, 9, 12–15]. Фактически нагрев такого раствора приводит к образованию трехфазной системы $(A_s + L + \beta_c)^+$, область существования которой на диаграммах на рис. 5 отмечена штриховкой. При прохождении через эту область отогреваемого раствора с начальной концентрацией $C_B < C_g^-$ в нем может образовываться не только кластерная фаза, но и дополнительная масса кристаллов льда A_s . Такое явление может возникать при условии $\dot{T}^- \gg \dot{T}^+$ и его вероятность существенно повышается при длительных временных остановках в области температур $T_g \dots T_C^+$. Эффекты, соответствующие этому процессу, были описаны Bronsteyn и Steponkus [5].

В свою очередь охлаждение раствора с начальной концентрацией C_B'' (рис. 5В) приводит к его полному стеклованию при температуре T_g без каких-либо промежуточных фазовых переходов. Последующему нагреву этого раствора соответствует траектория 2, согласно которой в нем происходит кластерная кристаллизация, сопровождающаяся максимальным отклонением концентрации раствора от исходного значения C_B'' на $\Delta C_B''$. Температура, при которой фиксируется это отклонение, соответствует максимуму экзотермических

с дальнейшим увеличением начальной концентрации раствора количество новообразованной кластерной фазы и, следовательно,



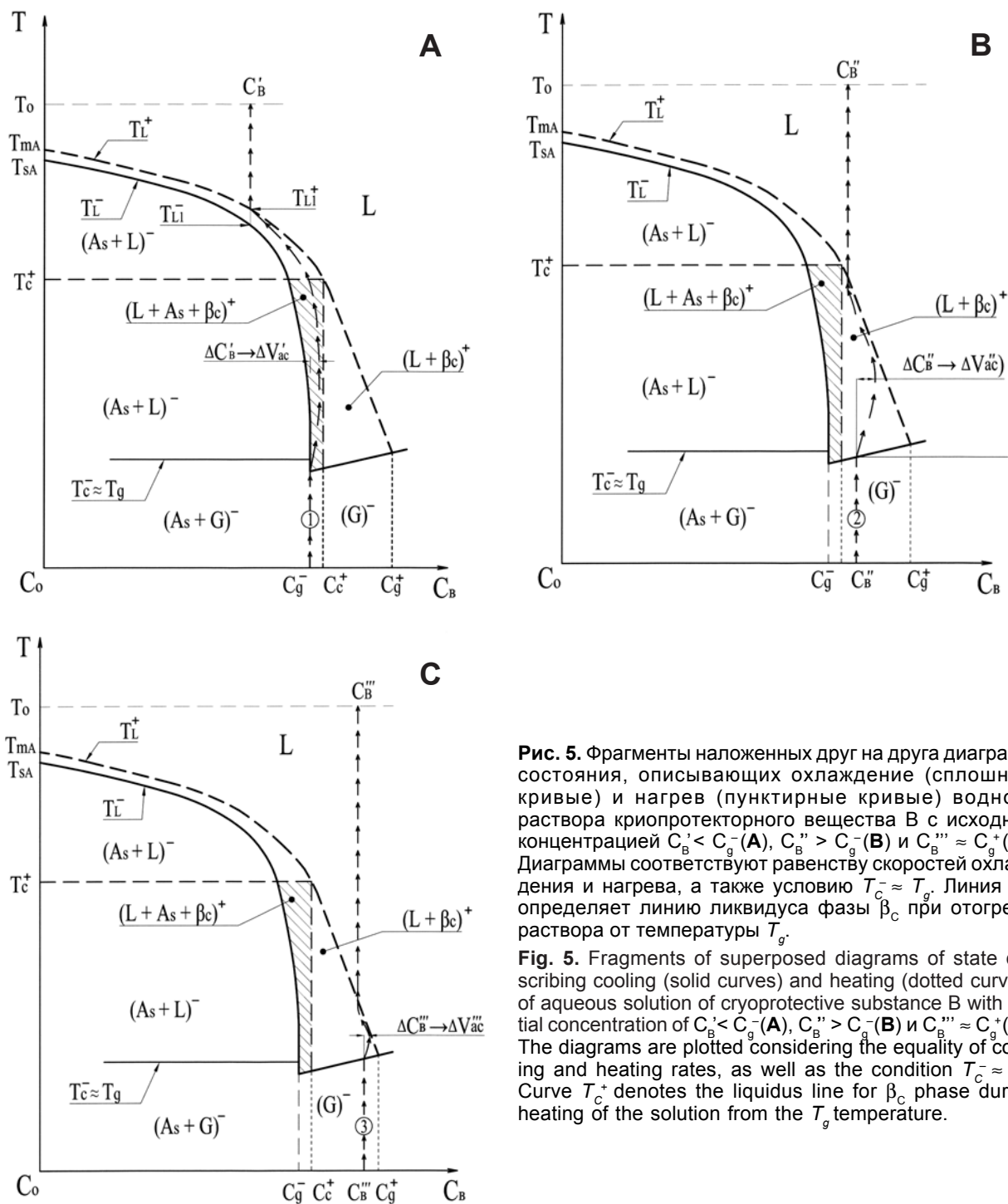


Рис. 5. Фрагменты наложенных друг на друга диаграмм состояния, описывающих охлаждение (сплошные кривые) и нагрев (пунктирные кривые) водного раствора криопротекторного вещества В с исходной концентрацией $C_B' < C_g^-$ (**А**), $C_B'' > C_g^-$ (**В**) и $C_B''' \approx C_g^+$ (**С**). Диаграммы соответствуют равенству скоростей охлаждения и нагрева, а также условию $T_c^- \approx T_g$. Линия T_c^+ определяет линию ликвидуса фазы β_c при отогреве раствора от температуры T_g .

Fig. 5. Fragments of superposed diagrams of state describing cooling (solid curves) and heating (dotted curves) of aqueous solution of cryoprotective substance В with initial concentration of $C_B' < C_g^-$ (**A**), $C_B'' > C_g^-$ (**B**) and $C_B''' \approx C_g^+$ (**C**). The diagrams are plotted considering the equality of cooling and heating rates, as well as the condition $T_c^- \approx T_g$. Curve T_c^+ denotes the liquidus line for β_c phase during heating of the solution from the T_g temperature.

тепловых пиков на термограммах исследуемых растворов или максимальным объемным эффектам $\Delta V_{ac}''$ на зависимостях объема нагреваемых растворов от температуры.

При дальнейшем увеличении концентрации исходного раствора количество вновь образующейся кластерной фазы, а значит, и величина соответствующих объемных или тепловых эффектов начинают резко уменьшаться и становятся рав-

the value of corresponding volumetric or thermal effects begin to decrease sharply and become equal to zero at $C_B \geq C_g^+$. In the Fig. 5C the curve 3 demonstrates it well by describing the behaviour of the solution with concentration C_B''' .

It should be noted that exactly this behaviour of thermal peaks in the thermograms is observed experimentally when the initial concentration of the solutions approaches the imaginary eutectic concentration



ными нулю при $C_B \geq C_g^+$. На схеме рис. 5, С это наглядно демонстрирует траектория 3, описывающая поведение раствора с концентрацией C_B''' .

Следует особо отметить, что именно такое поведение тепловых пиков на термограммах экспериментально наблюдается при приближении исходной концентрации растворов к мнимой эвтектической концентрации $C_{eut}' \approx C_g$ [1, 4, 13–15] и находится в полном противоречии с диаграммами состояний эвтектического типа. Это полностью соответствует закономерностям кластерной кристаллизации, поскольку с увеличением концентрации C_B в растворе уменьшается количество гидратированных молекул B , способных участвовать в образовании частиц кластерной фазы.

Необходимо уточнить, что на схемах рис. 5 интервалы изменений концентрации жидкой фазы при кластерной кристаллизации на $\Delta C_B'$, $\Delta C_B''$ и $\Delta C_B'''$ отмечены условно (для большей наглядности). В связи с тем, что при образовании кластерных частиц из раствора выбывают как молекулы воды, так и молекулы криопротекторного вещества, концентрация остающейся жидкой фракции может изменяться при этом незначительно.

4. Анализ равновесных состояний замороженных криопротекторных растворов

Современные технологии криоконсервирования биообъектов используют относительно высокие скорости охлаждения, при которых структура замораживаемых жидких фракций (в том числе криопротекторных растворов), как правило, является метастабильной. Поскольку практическая криобиология работает именно с такими неравновесными состояниями, их изучение является целью большинства работ в области структурного анализа замораживаемых криопротекторных растворов [5–7]. Однако анализ возможных равновесных состояний этих растворов также необходим, причем не только с теоретической точки зрения. Его важность определяется тем обстоятельством, что при длительном хранении биообъектов ниже температур стеклования криопротекторных растворов в их структуре неизбежно протекают процессы, направленные на достижение равновесия [9]. Такие структурные перестройки могут инициировать механизмы повреждения длительно хранящегося биоматериала. Ингибировать эти механизмы невозможно без определенных представлений о природе равновесных структурных состояний, которые можно получить, основываясь только на равновесных диаграммах состояния. В разделе 2 статьи указаны причины, по которым для замораживаемых криопротекторных растворов нельзя использовать эвтектические диаграммы. Одной из них

$C_{eut}' \approx C_g$ [2, 12–15] and fully contradicts the state diagrams of an eutectic type. This is completely consistent with the regularities of cluster crystallization, since with increasing the concentration C_B in the solution the number of hydrated molecules B , being capable to participate in forming cluster phase particles is decreased.

It should be specified that Fig. 5 shows only conditionally marked intervals of changes in liquid phase concentration during cluster crystallization by $\Delta C_B'$, $\Delta C_B''$ and $\Delta C_B'''$ (for better visibility). Due to the fact that both water molecules and those of cryoprotective agent are leaving the solution during cluster particles formation, the concentration of the remaining liquid fraction thereby may vary insignificantly.

4. Analysis of equilibrium states of frozen cryoprotective solutions

Current techniques for biological object cryopreservation apply relatively high cooling rates, when the structure of frozen liquid fractions (including the cryoprotective solutions) is usually metastable. Since applied cryobiology deals exactly with these non-equilibrium states, their study is the aim of most researches in the field of structural analysis of frozen cryoprotective solutions [3–5]. However, it is also essential to analyse the possible equilibrium states of these solutions, and this would be not only of theoretical value. Its importance is determined by the fact that during a long-term storage of biological objects at the temperatures below vitrification points of cryoprotective solutions, the processes targeted to achieve equilibrium occur in their structure inevitably [7]. Such a structural re-arrangements could initiate the mechanisms of injury in long-term stored biospecimens. It is impossible to prevent these mechanisms without certain hypotheses about the origin of equilibrium structural states, which could be obtained only basing on the equilibrium phase diagrams. The section 2 of this paper contains the reasons, restricting the use of eutectic diagrams for frozen cryoprotective solutions. One of them is a need to break H-bonds between water molecules and a cryoprotective agent. Without meeting this requirement it is impossible to form the equilibrium structures of eutectic type. At the same time, the diagrams of state which consider cluster phase allow to simulate the equilibrium structures without meeting this condition.

Fig. 6 shows a complete phase diagram of two-component cryoprotective solution, including cluster phase β_{ca} based on the ice nanocrystals a_s and the one β_{cb} based on nanocrystals of cryoprotective agents b_s . According to this plot, there is some temperature T_β^0 when the values of critical nuclei a_s^0 and b_s^0 are so small that an entire liquid phase of concentration C_β is



является необходимость разрыва Н-связей между молекулами воды и криопротекторного вещества. Без выполнения этого требования невозможно сформировать равновесные структуры эвтектического типа. В то же время диаграммы состояния, включающие кластерную фазу, позволяют смоделировать равновесные структуры без выполнения этого условия.

На рис. 6 показана полная диаграмма состояния двухкомпонентного криопротекторного раствора, включающая кластерные фазы β_{ca} на основе нанокристаллов льда a_s и β_{cb} на основе нанокристаллов криопротекторного вещества b_s . Согласно представленной диаграмме существует некоторая температура T_β , при которой величины критических зародышей a_s^0 и b_s^0 малы настолько, что вся жидкая фаза концентрации C_β способна перейти в твердофазную смесь кластеров β_{ca} и β_{cb} . В этом случае структура раствора при $T < T_\beta$ зависит от его исходной концентрации. В диапазоне исходных концентраций $C_0 \dots C_{CA}$ замороженный раствор состоит из двух равновесных фаз A_s и β_{ca} , в диапазоне исходных концентраций $C_{CA} \dots C_\beta$ и $C_\beta \dots C_{CB}$ из одной кластерной фазы β_{ca} или β_{cb} , соответственно, а в диапазоне концентраций $C_{CB} \dots C_1$ опять из двух фаз B_s и β_{cb} . Точка γ на данной диаграмме соответствует равновесию трех фаз L , β_{ca} и β_{cb} . Все представленные на диаграмме структурные композиции не содержат аморфную фракцию и полностью удовлетворяют условиям (1) и (2), т. е. являются равновесными. Однако такие равновесные состояния могут достигаться при охлаждении только в случае выполнения условия $T_g < T_\beta$. Если же выполняется условие $T_g > T_\beta$, которое, как правило, реализуется на практике, их достижению препятствует стеклование жидких фракций, остающихся в системе к моменту достижения температуры стеклования T_g . Это условие схематически изображено на диаграмме рис. 6 двойной линией с внутренней штриховкой. В этом случае при $T < T_g$ структурные композиции во всем интервале концентраций $C_0 \dots C_1$ будут содержать аморфные фракции G , т. е. являться метастабильными. Более того, в данном случае на диаграмме состояний обязательно существует интервал исходных концентраций $C_{gA} \dots C_{gB}$, в котором охлажденный раствор полностью стеклуется независимо от скорости его охлаждения. Скорость охлаждения здесь влияет только на ширину этого интервала. Из представленной на рис. 6 схемы можно сделать следующие выводы:

– метастабильность возникающих в криопротекторных растворах структур в большей степени связана не со скоростью их охлаждения, а с соотношением температур T_g и T_β ;

capable of transforming into a solid phase mixture of β_{ca} and β_{cb} clusters. In this case, the structure of the solution at $T < T_\beta$ depends on its initial concentration. Within the range of initial concentrations $C_0 \dots C_{CA}$ a frozen solution consists of two equilibrium phases A_s and β_{ca} , within the range of initial concentrations $C_{CA} \dots C_\beta$ and $C_\beta \dots C_{CB}$ it contains only one cluster phase β_{ca} or β_{cb} , respectively, and within the concentration range of $C_{CB} \dots C_1$ it comprises again two phases B_s and β_{cb} . The point γ in this diagram corresponds to the equilibrium of three phases L , β_{ca} and β_{cb} . All the structural compositions presented in the diagram comprise no amorphous fraction and completely meet the conditions (1) and (2), i. e. they are in equilibrium. However, such equilibrium states can be achieved during cooling only if meeting the condition $T_g < T_\beta$. If another case is realized, i. e. $T_g > T_\beta$, that is usually observed in practice, achievement of the equilibrium is prevented by vitrification of liquid fractions remaining

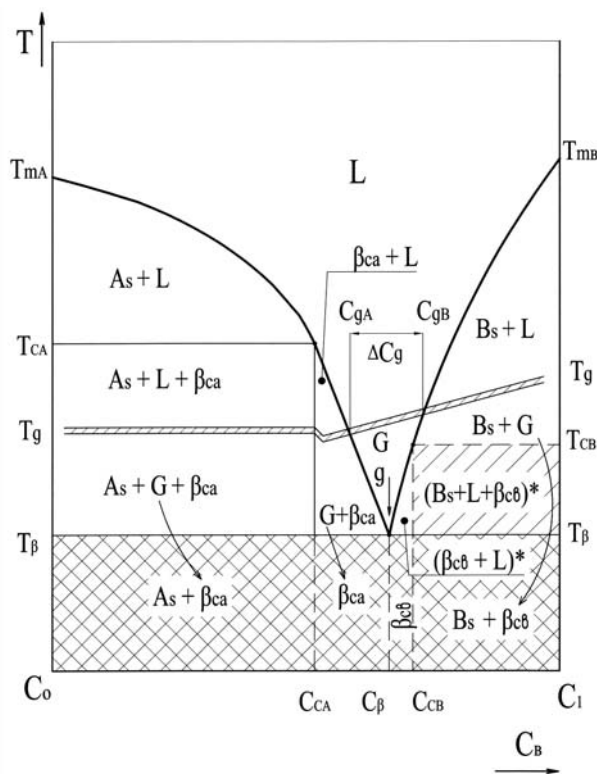


Рис. 6. Полная диаграмма состояния двухкомпонентного криопротекторного раствора, соответствующая условиям $T_{CA}^- = T_{CA}^+$ и $T_{CB}^- = T_{CB}^+$, где T_{CA} и T_{CB} – линии ликвидуса кластерных фаз на основе микрокристаллов льда a_s и криопротекторного вещества b_s соответственно. Линия T_β на диаграмме обозначает линию солидуса кластерных фаз β_{ca} и β_{cb} .

Fig. 6. Complete diagram of state of two-component solution for $T_{CA}^- = T_{CA}^+$ and $T_{CB}^- = T_{CB}^+$, where T_{CA} and T_{CB} are liquidus lines of cluster phases based on microcrystals of ice a_s and cryoprotective substance b_s , correspondingly. Line T_β in the diagram denotes the solidus line of cluster phases β_{ca} and β_{cb} .



– достижение равновесных структурных состояний в этих растворах, охлажденных ниже температуры T_{β} , состоит в трансформации аморфных фракций G в кластерные фазы β_{ca} и β_{cb} (показано стрелками, направленными в равновесную зону, условно отмеченную на диаграмме двойной штриховкой).

Приведенная на рис. 6 температура стеклования раствора T_g удовлетворяет условию:

$$T_{CB} < T_g < T_{CA} \quad (4)$$

Очевидно, что в этом случае в диапазоне температур $T_g \dots T_{\beta}$ не будет происходить образование кластеров на основе микрокристаллов криопротекторного вещества непосредственно из жидкой фазы L . При выполнении условия (4) области равновесия фаз $\beta_{cb} + L$ и $B_s + L + \beta_{cb}$ на диаграмме состояний будут отсутствовать. Однако это не исключает протекание процессов $G \rightarrow \beta_{cb}$ в охлажденных ниже температуры T_{β} растворах в области исходных концентраций $C_B > C_{\beta}$ (показано соответствующей стрелкой на рис. 6).

5. Заключение

Рассмотренная модель кластерной кристаллизации впервые объясняет образование второй твердой фазы в охлаждаемых криопротекторных растворах, без использования диаграмм эвтектического типа. При этом устраняется целый ряд противоречий, возникающих при попытках объяснить экспериментальные результаты, полученные при изучении кинетики кристаллизации и плавления растворов, в рамках классических эвтектических закономерностей. Это обусловлено особенностями структуры частиц кластерной фазы. Их образование не требует разрыва H-связей между молекулами воды и криопротекторного вещества, что обеспечивает протекание кластерной кристаллизации в очень широком температурном диапазоне, вплоть до температур стеклования T_g . Кластеры могут содержать как кристаллические, так и аморфные фрагменты, что допускает их образование в водных растворах некристаллизующихся криопротекторов. Также модель двухэтапного образования кластеров позволяет объяснить несовпадения диаграмм состояния, описывающих охлаждение и последующий отогрев замораживаемых растворов при равенстве абсолютных значений скоростей охлаждения и нагрева. Такое несовпадение противоречит классическим условиям образования эвтектик.

Представленные в работе диаграммы состояния, включающие области существования кластер-

in the system to the moment of reaching vitrification temperature T_g . This condition is shown schematically in Fig. 6 by double line with internal shading. In this case all the structural compositions at $T < T_g$ within the whole range of concentrations $C_0 \dots C_1$ would contain amorphous fraction G , *i.e.* these would be metastable. Moreover, in this case a diagram of state would definitely contain a range of initial concentrations $C_{gA} \dots C_{gB}$, wherein the cooled solution would completely vitrify independently on the rate of its cooling. Cooling rate affects here only the width of this range. Proceeding from the scheme presented in Fig. 6 the following conclusions could be made:

– the metastability of the structures occurred in cryoprotective solutions is associated with the ratio of T_g and T_{β} temperatures rather than with the rate of their cooling;

– achieving the equilibrium structural states in these solutions cooled below temperature T_{β} , consists in transforming the amorphous fractions G into cluster phases β_{ca} and β_{cb} (shown by arrows pointing to equilibrium zone, conventionally marked with double shading in the diagram).

The temperature of vitrification T_g of the solution shown in Fig. 6 meets the condition:

$$T_{CB} < T_g < T_{CA} \quad (4)$$

Obviously, in this case no formation of clusters based on microcrystals of cryoprotective agent directly from a liquid phase L will occur within the temperature range of $T_g \dots T_{\beta}$. When meeting the condition (4) no areas of equilibrium phases $\beta_{cb} + L$ and $B_s + L + \beta_{cb}$ would be present in state diagrams. However, this does not exclude the occurrence of $G \rightarrow \beta_{cb}$ processes in the solutions cooled below T_{β} temperature within the range of initial concentrations $C_B > C_{\beta}$ (shown by corresponding arrow in Fig. 6).

5. Conclusion

For the first time the presented model of cluster crystallization explains the formation of the second solid phase in cooled cryoprotective solutions without using the eutectic type diagrams. This eliminates a number of contradictions arising when trying to explain the experimental results obtained when studying the kinetics of solution crystallization and melting within the framework of standard eutectic regularities. This is stipulated by the structure peculiarities of cluster phase particles. Their formation requires no rupture of H-bonds between water and cryoprotective agent molecules, that allows cluster crystallization within a very wide temperature range including the temperature of vitrification T_g . Clusters may contain both crystalline



ной фазы, допускают наличие второй твердой фазы на фоне жидких или аморфных фракций, что наблюдается экспериментально и не могло быть объяснено с классической точки зрения. Этот факт подчеркивает различие между кластерной и эвтектической кристаллизациями. В последнем случае при условии $T_g < T_{eut}$ невозможно образование аморфных фракций, а при $T_g > T_{eut}$ – образование второй твердой фазы в системе.

Кроме того, диаграммы состояния, включающие области существования кластерной фазы, позволяют сформулировать представления о равновесных структурах замороженных криопротекторных растворов и предсказать природу процессов, направленных на достижение этих структур в криоконсервируемых биосистемах. В частности, согласно этим диаграммам, возникающие в замораживаемых растворах метастабильные состояния связаны не с высокими скоростями их охлаждения, а с условием $T_g > T_\beta$, определяемым природой раствора. В данном случае вариациями скоростей охлаждения можно только изменять количество образующейся аморфной фракции.

Анализ кинетики кристаллизации-плавления криопротекторных растворов, проведенный на основе диаграмм состояния, включающих кластерную фазу, показывает необходимость классификации используемых в криобиологии криопротекторных растворов по параметрам их кластерной кристаллизации. Особого внимания заслуживает вопрос о связи этих параметров с механизмами повреждения биообъектов, обусловленных кластерной кристаллизацией. Детальное изучение этих механизмов, действующих вблизи температур стеклования, позволит повысить эффективность работ по созданию и оптимизации технологий криоконсервирования биообъектов.

Литература

1. Зинченко А.В., Манк В.В., Моисеев В.А. и др. О фазовых переходах и физических состояниях системы вода-пропандиол // Доклады АН СССР. – 1983. – Т. 269, №1. – С. 144–146.
2. Физическое металловедение / Под ред. Р. Кана. – М.: Мир, 1968. – Т. 2. – 490 с.
3. Bevan O.J., Goates R.J. Lamb J.D. Solid-liquid phase equilibria in water + ethylene glycol // J. Chem. Thermodynamics. – 1972. – Vol. 4, №1. – P. 123–126.
4. Bohon R.G., Conway W.T. DTA studies of the glycerol-water system // Thermochim. Acta. – 1972. – Vol. 4, №3–5. – P. 321–341.
5. Boutron P., Kaufmann A. Metastable states in the system water-ethanol. Existence of a second hydrate, curious properties // J. Chem. Phys. – 1978. – Vol. 68, №11. – P. 5032–5041.
6. Boutron P., Kaufmann A. Stability of the amorphous state in the system water-1,2-propanediol // Cryobiology. – 1979. – Vol. 16, №6. – P. 557–568.

and amorphous fragments that allows their formation in aqueous solutions of non-crystallizing cryoprotectants. The model of a two-stage cluster formation enables also to explain the discrepancy between diagrams of state describing the cooling and subsequent heating of frozen solutions in case of equal absolute values of cooling and heating rates. Such a discrepancy could not exist according to the classic conditions for formation of eutectics.

State diagrams represented here, include the areas of cluster phase existence, and admit the presence of the second solid phase on the background of liquid or amorphous fraction, that is observed experimentally and could not be explained using the classic approaches. This fact underlines the difference between the cluster and eutectic crystallizations. In the latter case, if $T_g < T_{eut}$ no formation of amorphous fractions is possible and if $T_g > T_{eut}$ no second solid phase could appear in the system.

Moreover, the state diagrams which consider the areas of cluster phase existence enable to hypothesize the equilibrium structures of frozen cryoprotective solutions and to predict the nature of the processes targeted to form these structures in cryopreserved biosystems. In particular, according to these diagrams, the metastable states appearing in frozen solutions are associated with the condition $T_g > T_\beta$ originated from the solution nature rather than with high rates of their cooling. In this case, the varying of cooling rates could affect only the amount of resulting amorphous fraction.

The analysis of crystallization-melting kinetics in cryoprotective solutions, performed on the basis of state diagrams, which include cluster phase, shows the necessity to classify the cryoprotective solutions applied in cryobiology by the parameters of their cluster crystallization. Of particular attention is the question of relationship of these parameters with the mechanisms of biological objects injury, stipulated by cluster crystallization. Detailed study of these mechanisms acting near vitrification temperatures would improve the efficiency of efforts in developing and optimizing technologies to cryopreserve biological specimens.

References

1. Bevan O.J., Goates R.J. Lamb J.D. Solid-liquid phase equilibria in water + ethylene glycol. J Chem Thermodynamics 1972; 4(1): 123–126.
2. Bohon R.G., Conway W.T. DTA studies of the glycerol-water system. Thermochim Acta 1972; 4(3–5): 321–341.
3. Boutron P., Kaufmann A. Metastable states in the system water-ethanol. Existence of a second hydrate, curious properties. J Chem Phys 1978; 68(11): 5032–5041.
4. Boutron P., Kaufmann A. Stability of the amorphous state in the system water-1,2-propanediol. Cryobiology 1979; 16(6): 557–568.



7. Bronsteyn V.L., Steponkus P.L. Nucleation and growth of ice crystals in concentrated solutions of ethylene glycol // *Cryobiology*. – 1995. – Vol. 32, №1. – P. 1–22.
8. Cocks F.H., Brower W.E. Phase diagram relationships in cryobiology // *Cryobiology*. – 1974. – Vol. 1, №4. – P. 340–358.
9. Fuller B.I., Lane N.A., Benson E.E. *Life in the frozen state*. – Boca Raton, FL: CRC Press, 2004. – 672 p.
10. Malsam J., Aksan A. Hydrogen bonding and kinetics/thermodynamics transition of aqueous trehalose solutions at cryogenic temperature // *J. Phys. Chem. B*. – 2009. – Vol. 113, №19. – P. 6792–6799.
11. Osetsky A.I. Peculiarities of state diagrams of aqueous solutions of cryoprotective agents // *Cryobiology*. – 2009. – Vol. 59, №2. – P. 141–149.
12. Osetsky A.I. Thermodynamic aspects of cluster crystallization in cryoprotective solution // *CryoLetters*. – 2011. – Vol. 32, №3. – P. 216–224.
13. Rasmussen D.H., MacKenzie A.P. Phase diagram for the system water-dimethylsulfoxide // *Nature*. – 1968. – Vol. 220, №5174. – P. 1315–1317.
14. Rasmussen D.H., Luyet B.J. Complementary study of some non-equilibrium phase transition in frozen solutions of glycerol, ethylene glycol, glyucose and sucrose // *Biodynamica*. – 1969. – Vol. 10, №220. – P. 319–331.
15. Zinchenko A.V., Zinchenko V.D. On phase transitions in the water-ethylene glycol system at subzero temperatures under nonisothermal conditions // *CryoLetters*. – 2001. – Vol. 22, №3. – P. 191–198.
5. Bronsteyn V.L., Steponkus P.L. Nucleation and growth of ice crystals in concentrated solutions of ethylene glycol. *Cryobiology* 1995; 32(1): 1–22.
6. Cocks F.H., Brower W.E. Phase diagram relationships in cryobiology. *Cryobiology* 1974; 1(4): 340–358.
7. Fuller B.I., Lane N.A., Benson E.E. *Life in the frozen state*. Boca Raton: CRC Press, 2004.
8. Khan R.W., editor. *Physical metallurgy*. Amsterdam; 1965.
9. Malsam J., Aksan A. Hydrogen bonding and kinetics/thermodynamics transition of aqueous trehalose solutions at cryogenic temperature. *J Phys Chem B* 2009; 113(19): 6792–6799.
10. Osetsky A.I. Peculiarities of state diagrams of aqueous solutions of cryoprotective agents. *Cryobiology* 2009; 59(2): 141–149.
11. Osetsky A.I. Thermodynamic aspects of cluster crystallization in cryoprotective solution. *CryoLetters* 2011; 32(3): 216–224.
12. Rasmussen D.H., Luyet B.J. Complementary study of some non-equilibrium phase transition in frozen solutions of glycerol, ethylene glycol, glyucose and sucrose. *Biodynamica* 1969; 10(220): 319–331.
13. Rasmussen D.H., MacKenzie A.P. Phase diagram for the system water-dimethylsulfoxide. *Nature* 1968; 220(174): 1315–1317.
14. Zinchenko A.V., Mank V.V., Moiseyev V.A. et al. About phase transitions and physical states of water-propanediol system. *Proceedings of Academy of Sciences of SU* 1983; 269(1): 144–146.
15. Zinchenko A.V., Zinchenko V.D. On phase transitions in the water-ethylene glycol system at subzero temperatures under nonisothermal conditions. *CryoLetters* 2001; 22(3): 191–198.

