

生物学研究中常用的缓冲剂——N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸的制备

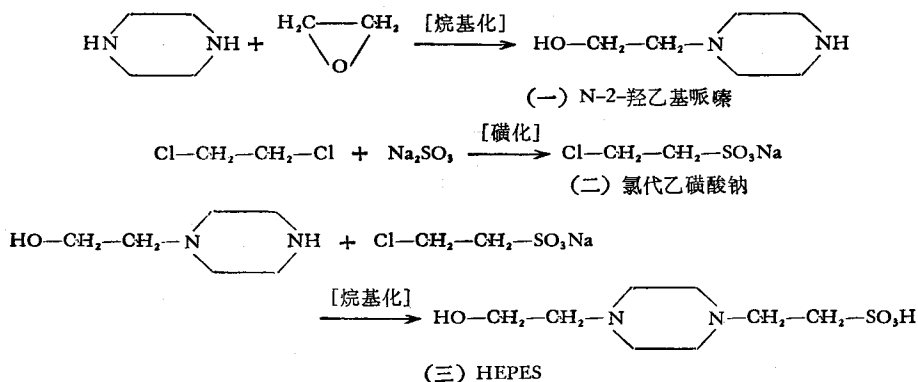
崔浩吉 卢银根

(中国科学院上海生物化学研究所东风生化试剂厂)

N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸 (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid 简称 HEPES) 是生物学研究的一种重要的缓冲剂。它最初由 Good 等人^[1]制备和试用。HEPES 一类缓冲剂, 易溶于水, 难溶于其它溶剂, 与多价金属离子 (Mg^{++} , Mn^{++} , Ca^{++} , Cu^{++}) 不发生沉淀反应, 解离作用极少受其浓度, 温度, 离子组成或培养基盐份的影响, 不易被酶等分

解; 在可见光和紫外光区域均无光吸收等特点, 适合用于组织培养、植物线粒体的氧化磷酸化、细菌的无细胞的蛋白质合成、光合磷酸化以及离体的叶绿体的二氧化碳固定等方面的研究工作^[2]。为了满足科研工作的需要, 我们全部采用国产试剂, 试制和生产了 HEPES。产品经初步鉴定证明, 其缓冲容量及用于疟原虫的体外培养方面与国外同类产品的性能基本一致。

一、合成路线



二、制备方法

1. N-2-羟乙基哌嗪的合成

在 2 升三颈烧瓶上装置封闭式机械搅拌器, 回流冷凝器, 通气玻璃管。烧瓶中放入 800 克 (4 克分子) 六水哌嗪, 600 毫升乙醇, 搅拌后成无色透明清液。在 80℃ 保温条件下, 边回流边通入环氧乙烷 200 毫升 (约 4 克分子), 1 小时内通毕。反应结束后, 减压蒸发除去乙醇, 残留物呈棕红色油状。用真空分馏法分离提纯, 收集沸程 125°—127°C/12 毫米汞柱的馏出部

分。得淡灰白色粘性油状物 240 克。产率 60%, d_{20} 1.0595; n_D^{20} 1.555^[3]。

2. 氯代乙磺酸钠的合成^[4]

在 5 升三颈烧瓶上, 装封闭式机械搅拌器, 回流冷凝管、滴液漏斗。烧瓶中放入 88 克 (0.65 克分子) 无水亚硫酸钠和 2500 毫升水, 外用水浴加热。启动搅拌, 当反应液达 90℃ 时, 保持此温度, 自滴液漏斗滴加入 1,2-二氯乙烷, 二小时内滴加 90 毫升 (1.1 克分子)。滴完后继续回流四小时。然后将反应液在 70℃ 水浴中减压浓缩至白色固体全部析出白色固体为氯代乙磺

酸钠、未作用的亚硫酸钠以及反应副产物氯化钠的混合物。将此固体悬浮于 1400 毫升 95% 乙醇中,加热回流四小时,趁热滤去不溶物。清液在 0℃ 放置过夜。次日,用布氏漏斗抽滤收集白色片状结晶。(母液减压浓缩后还可得到较多的合格产品)。在 80℃ 烘箱烘至恒重,得 70—80 克。产率按亚硫酸钠计算为 70—80%;元素分析:含氯量为 24.29%(计算值为 21.29%)。含硫量为 17.54%(计算值为 19.25%)。

3. HEPES 的合成

在 1 升三颈烧瓶上,同上步装置。烧瓶中放入 126 克 (0.75 克分子)氯代乙磺酸钠、98 克 (0.75 克分子)羟乙基哌嗪、500 毫升水。搅拌后为无色透明清液 (pH13 以上)。外用 110—115℃ 油浴保温。启动搅拌器,反应 20 分钟后,反应液 pH 逐渐下降为 9,此时,自滴液漏斗滴加 5N 氢氧化钠,使反应液的 pH 值保持在 9—10 之间。1.5 小时后,反应液的 pH 不再下降,停加氢氧化钠(共计用去 100 毫升左右)。继续回流搅拌半小时,反应结束。待反应液冷却后,用水稀释至 10 升,待上 732 离子交换树脂 [H⁺]* 层析柱去盐纯化:

将稀释后的反应液,以 50 毫升/分的速度流经层析柱。此时流出液 pH 为 1。上柱结束后,用水洗至流出液 pH 为 6。然后用 0.2N 氨水洗脱,收集洗脱流出液(弃去最先收集的 500 毫升)。正式收集 pH 6 以上的流出液。当流出液 pH 上升到 7.5 时,产品几乎全部洗下来。当 pH 上升到 8 时,停止洗脱。共收集 7 升左右。收集液在 70℃ 水浴中减压浓缩至 1 升体积,用活性炭脱色过滤。无色透明清液继续浓缩至厚糖浆状。趁热倒入 500 毫升沸腾之 95% 乙醇,使之全溶,用冰醋酸调 pH 至 5 (约用去 10—15 毫升)。立即加入 500 毫升无水乙醇,白色结晶随之析出,室温下自然冷却,0℃ 放置过夜。次日,用布氏漏斗抽滤收集结晶,用冰冷无水乙醇洗结晶,滤干时湿重 150—170 克。粗品不必干燥,立即悬浮于 500 毫升 95% 乙醇中,加热到 75℃ 时,慢慢地滴加水,使之全溶(约用去 50 毫升)。趁热过滤,清液加 500 毫升无水

乙醇,在摇动下自然冷却,使白色结晶呈疏松状慢慢析出。0℃ 放置过夜。次日,用布氏漏斗抽滤收集结晶,用冰冷无水乙醇洗结晶。80℃ 烘箱烘至恒重。得 105—120 克。产率 56—64%,熔点 210℃。

三、HEPES 的质量鉴定

按上述方法制备的 HEPES 与 E. Merck 的同类产品,分别配成 0.01M 溶液,各取 10 毫

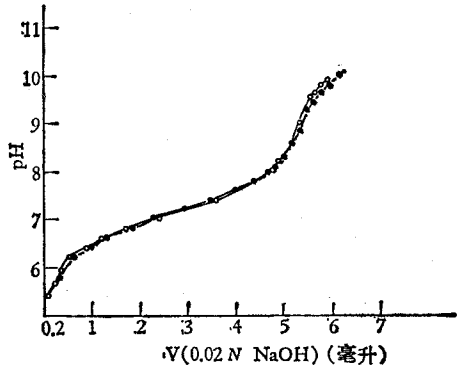


图 1 本厂和 E. Merck 厂的 HEPES 在缓冲容量方面的比较
—○—○— 东风厂产品 —●—●— E. Merck 产品

表 1 本厂和 E. MerckT 的 HEPES 用于疟原虫体外培养方面的对比

培养天	疟原虫的寄生率(%)		培养液 pH 变化	
	东风厂	E. Merck	东风厂	E. Merck
0.	2.24	2.24	7.16	7.16
1.	3.63	3.52	7.59	7.52
2.	3.74	4.12	7.62	7.55
3.	4.08	4.27	7.51	7.47
4.	4.43	3.69	7.58	7.52
5.	3.90	3.53	7.59	7.51
6.	4.11	3.80	—	—
7.	5.20	5.12	7.48	7.49
8.	5.97	5.32	7.47	7.41

* 于直径为 7.5 厘米的玻璃层析柱中,装入上海树脂厂生产的 732 强酸性阳离子交换树脂,树脂层高 29 厘米。先用相当于树脂体积二倍的 1N 氨水流经树脂,用水洗至中性,再用相当于树脂体积二倍的 2N 盐酸,将树脂再生为 [H⁺] 型,用水洗至中性备用。

升, 在 pH S-3 型酸度计 (上海第二分析仪器厂) 上, 用 0.02N 氢氧化钠滴定, 测定各自的缓冲容量, 所得的结果见图 1。

另外, 上海生物制品研究所中心研究室, 在疟原虫体外培养基时, 分别加入我厂生产的 HEPES 和 E. Merck 的同类产品 25 毫克分子, 各培养两瓶, 比较疟原虫的寄生率的百分比及培养液 pH 变化情况, 见表 1。

由此可见, 我厂制备的 HEPES 与 E. Merck 同类产品, 具有相等的缓冲容量。在疟原虫的体外培养方面效果相似。对细胞无毒性影响。都能维持培养液的 pH 在 7.45 左右。

四、几点说明

1. 最后产品重结晶时, 滴加水不宜过多, 否则影响结晶的完全析出。此外, 加入乙醇后, 要

在室温下慢慢地自然冷却; 如果冷却过快, 结晶容易含水。含水结晶在烘干时, 会出现熔融。

2. HEPES 的熔点, 文献上报导为 234°C^[1]。实际上, 它的熔点差异很大, 一般在 210—234°C 之间。这可能是由于它容易吸潮的性质决定的。产品干燥越彻底, 熔点越接近 234°C, 反之越低。然而熔点的高低, 对作为缓冲剂使用并无影响。

参 考 文 献

- [1] Norman, E. G.: *Biochemistry*, 5, 467, 1966.
- [2] Norman, E. G. et al.: *Methods in Enzymology*, Vol. 24 (part B), 53, 1972.
- [3] John, D. M.: U. S. 2541260, Feb., 13, 1951.
- [4] Albert, S.: *C.A.*, 53, 11, 231 1959.

[本文于 1979 年 10 月 15 日收到]

血清乳酸脱氢酶同工酶的测定 ——琼脂糖凝胶电泳法

王 金 寿

(湖北黄石矿务局医院)

乳酸脱氢酶 (LDH) 是一种参与糖酵解过程的重要的酶, 广泛存在于机体各器官、组织中, 当这些组织有炎症或坏死时, 血清中 LDH 总活性和同工酶酶谱都有改变。在心脏疾患时, 血清中 LDH₁ 明显增高, 而肝脏疾患时 LDH₅ 明显增高。因此, 临床上日益广泛应用 LDH 同工酶分析、作为某些疾病的早期诊断和鉴别诊断方法, 生物学上可用作肿瘤研究、生物分类, 遗传学研究的新手段。

LDH 同工酶的分离及测定方法有区带电泳法、层析法及免疫化学法等, 其中以区带电泳法较常用。我们曾对醋酸纤维素薄膜电泳, 琼脂糖凝胶电泳及聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳分离 LDH 同工酶的方法, 作初步比较, 认为用琼脂糖凝胶电泳分离及测定 LDH 同工酶具有操作

简便、分离较好、区带整齐、显色清晰、无拖尾、容易定量, 便于保存等优点, 适于一般基层单位应用。现将此法简介如下:

材 料 与 方 法

1. 试剂

(1) 巴比妥钠—盐酸缓冲液 (pH 8.6, 0.06M)

(2) 0.5% 琼脂糖 琼脂糖 0.5 克, 巴比妥钠—盐酸缓冲液 50 毫升, 蒸馏水 48 毫升, 10 mM EDTA Na₂ 2 毫升, 隔水加热溶解。

(3) 脱色固定液 95% 乙醇 140 毫升; 冰乙酸 (1% 或 5%) 10 毫升; 蒸馏水 50 毫升; 混匀即成。

(4) 染色液 (以每块凝胶板之用量计算)