**实验五 胆红素的提取及含量测定**

**实验目的**

1）了解胆红素的性质及用途；

2）了解胆红素的常规制备方法；

3）通过本实验的具体操作，掌握并熟悉从动物的胆汁里提取制备胆红素的方法及操作原理和步骤；

4）掌握胆红素含量的测定方法。

**实验原理**

胆红素的分子式为C33H36N4O6，是一个直链的吡咯化合物，属于二烯胆素类，存在于动物的胆、肝脏中。胆红素易溶于苯、氯仿、二硫化碳中，微溶于乙醇和乙醚。它是配置人工牛黄的重要原料，而人工牛黄又是很多中成药配方的重要组成成分，例如：安宫牛黄丸、六神丸等。

目前国内外制取胆红素的方法有三种，包括全合成法、半合成法和直接从胆汁中提取。因为我国生猪资源丰富，所以目前此法比较盛行。本实验即是从胆汁中提取制备胆红素。

**操作方法**

1. 过滤 取新鲜或解冻的胆，用不锈钢剪刀剪破，用四层纱布过滤胆汁（除去油脂及杂质），然后称重移入烧杯中。
2. 皂化 将烧杯中的胆汁先在搅拌下加热至60-70℃，用8%左右的氢氧化钠液缓慢调节PH值至11-12，继续搅拌加热到90℃，保温10min左右（此时要十分小心，勿使泡沫溢出）。然后停止加热，取下冷却至50℃左右。
3. 酸化、抽提 量取以上皂化液，以30%的量加入氯仿，混合均匀，用1：10的盐酸边加边搅拌调至PH值为3.8—4.1（注意滴加盐酸要慢，大约100ml皂化液加10ml左右盐酸，PH值不可过大或过小，在此期间，溶液由奶黄变黄绿，最后呈棕黄色），然后移入分液漏斗，静置20min，即分为两层，下层为氯仿抽提液，上层为胆酸和水溶液，小心分出下层氯仿抽提液。上层废液再用20%氯仿重复抽提2次，合并下层氯仿抽提液。
4. 蒸馏、干燥 将以上氯仿抽提液移入蒸馏瓶中，在80-85℃下蒸馏，回收的氯仿可以反复使用。当瓶内液体无翻滚气泡，呈橘红色，瓶口氯仿气味很弱时，加入少量的95%乙醇继续蒸发，至氯仿全部蒸出时趁热过滤，用65℃的95%热乙醇小心冲洗一次，取出沉淀，干燥，置棕色瓶中保存备用。

**胆红素含量测定**

1. 原理 胆红素和重氮化试剂反应，产生偶氮染料，它在强酸中呈蓝紫色。在pH值2.0-5.5之间呈红色，在pH值5.5以上呈绿色。
2. 标准溶液和供试液的配制

精确称取标准胆红素0.0100g，供试样品胆红素0.0100g，分别以氯仿溶入50ml棕色容量瓶中，加氯仿至刻度。各取10ml加入50ml棕色容量瓶中，以95%乙醇稀释至刻度。标准溶液每毫升相当于0.00004g胆红素。

1. 标准曲线的绘制

精确吸取胆红素标准液1ml、2ml、3ml、4ml、5ml置于带色试管中，分别加入95%乙醇8ml、7ml、6ml、5ml、4ml，使全量均为9ml，再加入重氮化试剂1ml，混合均匀，在20℃暗处静置1h，在波长520nm处测吸光度，并以吸光度为纵坐标，各管所含的胆红素浓度为横坐标，画出标准曲线,如图1。

1. 样品测定 取供试液3mL，加95%乙醇6mL，重氮化试剂1mL，混匀，在暗处20℃静置1h，在波长520nm处测吸光度。由测得的吸光度从标准曲线上查胆红素的重量（mg），然后计算样品胆红素含量。



图1

**注意事项**

1. 皂化反应时，一般用8%的氢氧化钠液调节pH值至10.5—11.5。如加碱量不足，pH值偏低，水解不完全，有一部分胆红素仍以双葡萄糖胆红素酯的形式存在，降低了产品收率。加碱量过多，pH值偏高，容易引起氧化，而且给酸化后的分层造成困难。因此务必控制皂化pH值在10.5—11.5范围内。
2. 根据实践经验，夏季冷到30℃以下比较合适，在20min左右，酸化即可分层；而在冬季长控制在50℃左右，酸化后分层也比较快。
3. 当酸化不足时，溶液中有一部分胆红素阴离子不能与氢离子结合生成游离胆红素分子，即使分层，下层氯仿液色淡，产品收率明显下降。若酸化过度，一则容易引起氧化；二则粗结合型胆汁液将部分沉淀出来，不但分层困难，而且包裹现象严重，收率不高。
4. 加酸速度太快或者搅拌不均匀，既会造成局部酸浓度过高而导致胆红素氧化，又会产生粘性颗粒状物质将胆红素包容在其内部不能游离出来。这样，虽然酸化pH值达到了要求，但酸化仍不完全，影响产品收率。所以酸化时必须:注意加酸速度要缓慢，搅拌要充分、均匀。
5. 在本实验中待冷却后加入氯仿，然后再酸化。这是因为当酸化达到一定pH值范围时，游离胆红素开始逐渐生成，而胆红素溶于氯仿，这样形成一点溶解一点，能促进下列动态平衡向右移动，有利于胆红素分子的形成，使反应更加彻底。

胆红素 + H+ 胆红素分子