

# 差示分光光度法测定牛黄类中成药中胆红素的含量

倪坤仪 屠树滋 俞兵\* 郑露露\*\*

(中国药科大学, 南京 210009)

**提要** 本文利用胆红素溶液在光照下易氧化变色及其吸收光谱发生显著变化的性质, 在波长 453 nm 处, 测其光照前后的吸收度差值( $\Delta A$ ),  $\Delta A$  与胆红素溶液浓度呈线性关系, 对含牛黄的中成药(六应丸, 六神丸和牛黄消炎丸)中胆红素进行了定量, 并对其它组分进行了光照试验, 排除了光照对其它组分的影响, 从而确定了此法的可行性。

**关键词** 胆红素; 六应丸; 六神丸; 牛黄消炎丸; 差示分光光度法

胆红素为中药牛黄中的重要成分, 在天然牛黄中胆红素的含量高达 40 ~ 50%, 而含牛黄的中成药又多达百余种, 因此寻找一种测定中成药中胆红素的含量方法, 对控制中成药的质量很有必要。

王明亮<sup>(1)</sup>等用胆红素与重氮化试剂生成偶氮染料, 比色测定胆红素的含量; 韩咸泰等<sup>(2)</sup>用薄层扫描法对人工牛黄中胆红素进行了定量测定; 中成药中胆红素的测定方法报道<sup>(3)</sup>很少。本文根据胆红素见光易氧化变色, 在波长 453 nm 处测定光照前后的吸收度差值, 若中成药中无性质相似的干扰组分, 则可用于中成药中胆红素的含量测定。由于此法不需经过色谱或其它分离手段, 一般不受中成药中其它有色物质的干扰, 方法简单、迅速、准确, 可用于牛黄类中成药的质量控制。

## 原 理

胆红素具有高度共轭体系结构, 吸收光谱见图 1 (I), 在波长 453 nm 处为最大吸收<sup>(4)</sup>, 因此可直接比色测定胆红素的含量。同时胆红素在可见光照射下, 易氧化成蓝色产物<sup>(5, 6)</sup>, 在 453 nm 处吸收度显著降低, 如图 1 (II)所示。

中成药均含有很多组分, 含有胆红素的中成药一般还可能含有数种在波长 453 nm 处有吸收的组分, 用直接比色方法测定胆红素, 则受到这些组分的干扰。若中成药中其它多种干扰组分在本文所定的光照条件下, 吸收值在光照前后保持不变, 因此当它们与胆红素共存时, 可用  $\Delta A$  对胆红素进行定量。

光照前  $A_1 = A_{\text{胆红素}} + A_{\text{干扰组分}}$

光照后  $A_2 = A_{\text{胆红素}} + A_{\text{干扰组分}}$

本文于 1989 年 8 月 31 日收到。

本课题为国家自然科学基金资助项目。

\* 本校 1989 届毕业生; \*\* 上海中药一厂

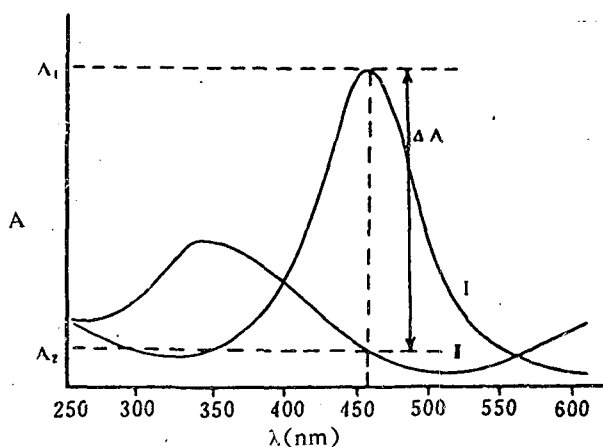


Fig 1. Absorption spectra of bilirubin in acidic chloroform solution  
I. Before light irradiation; II. After light irradiation

若  $A_{\text{干扰组分}} = A_{\text{干扰组分}}$

$$\Delta A = A_1 - A_2 = A_{\text{胆红素}} - A_{\text{胆红素}}$$

用差分分光光度法测定中成药中胆红素的含量, 对干扰组分的个数, 具体结构和含量都无需已知。

## 实 验 部 分

**仪器与药品** 752 分光光度计(上海第三分析仪器厂); UV300 可见紫外分光光度计(日本岛津); ST-II 型照度计(北京师范大学光电仪器厂)。

胆红素对照品(中国药品生物制品检定所提供, 含量 96%); 六应丸(上海中药一厂); 六神丸(武汉东西湖制药厂; 武汉辛安制药厂, 湖北黄石制药厂); 牛黄消炎丸(南京同仁堂制药厂)。

### 一. 光照条件

将下述标准曲线制备项下制得的五种标准系列溶液, 分别在阳光下照射或在红外灯(250W)下照射, 每隔 5 或 40 min 测定一次吸收度, 图 2 a, b 分别表示在不同光照条件下, 不同浓度胆红素溶液吸收度与时间的关系曲线, 由各条曲线可看到, 照射一定时间后, 吸收度即趋稳定, 溶液颜色由黄变绿至浅蓝, 并趋稳定。稀溶液达到稳定时间短, 而浓度稍大时间即需增加, V 号浓度为  $8.0 \mu\text{g/ml}$ , 在阳光下照射近 25 min 即能稳定, 红外灯下则需 3.3 h, 故测定时分别选用在日光下照射 30 min 或在红外灯下照射 4 h 测其  $\Delta A$ 。

### 二. $\Delta A$ — 浓度线性试验

精密称取胆红素 2 mg 于 50 ml 棕色容量瓶中, 加适量冷( $10^\circ\text{C}$  以下)的酸性氯仿(150 ml 氯仿中含 0.05 ml 浓盐酸), 于冰水浴中超声振荡 20 min, 稀释至刻度, 制成贮备液。准确吸取 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 ml 贮备液于 5 个 10 ml 容量瓶中, 加冷酸性氯仿至刻度, 测其光照前后 453 nm 处吸收度, 吸收度差值 ( $\Delta A$ ) 与胆红素溶液浓度  $C (\mu\text{g/ml})$  的回归方程为:  $\Delta A = 0.00570 + 0.0804C$ ,  $r = 0.9995$ 。除光照反应外, 其余操作均需避光。

### 三. 提取方式

精密称取六应丸粉末 4 份, 分别作冷浸 24 h 后超声提取和直接超声提取, 超声时间采

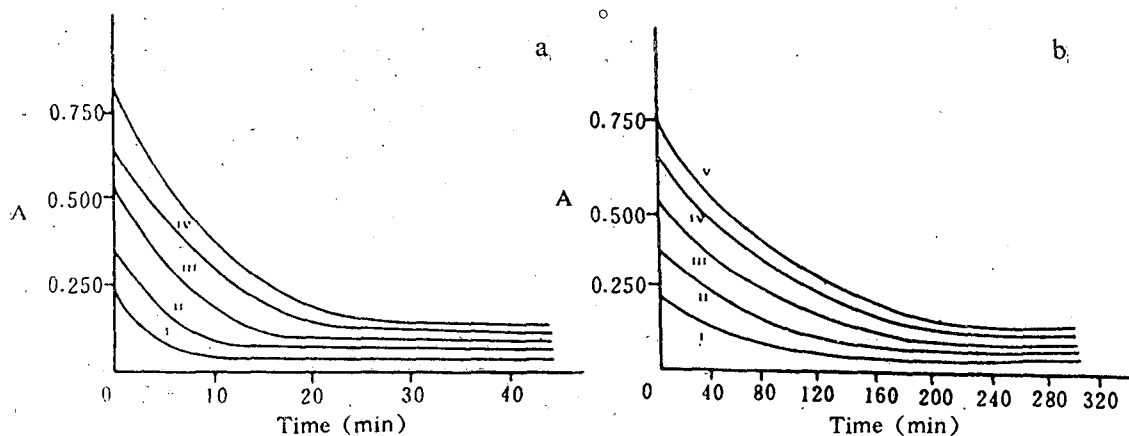


Fig 2 . Relationship between absorbance values and time of light irradiation . Concentrations of standard solutions of bilirubin for I, II, III, IV, V are 1.6, 3.2, 4.8, 6.4, 8.0  $\mu\text{g/ml}$  . a . Sun light ; b . Light from IR lamp .

用20 和 60 min 两种, 实验结果表明, 冷浸与直接提取相差不多, 超声 20 min 已完全, 故选用直接超声 20 min 提取。

#### 四. 提取溶剂选择

精密称取六应丸粉末 4 份, 分别用酸性氯仿和混合溶剂 (氯仿—乙醇—浓盐酸 35 : 15 : 0.05)<sup>(2)</sup>作溶剂于冰水浴中振荡提取 20 min 比较, 结果表明, 两种溶剂均可采用, 但用酸性氯仿提取,  $A_2$  较小, 可能引起的误差也小, 故选用酸性氯仿。

#### 五. 干扰组分的考察

六应丸主要由牛黄、珍珠、蟾酥、冰片、公丁香等组成; 六神丸主要由牛黄、珍珠、蟾酥、冰片、麝香等组成。精密称取不含牛黄的六应丸粉末 60 mg, 加冷酸性氯仿 10 ml, 于冰水浴中超声振荡提取, 测得其光照前后 453 nm 处的吸收度, 光照前  $A_1$  为 0.050, 光照后 A 值不变, 说明本文光照条件不影响六应丸中其它组分的吸收度, 即其它组分不影响六应丸中胆红素的测定, 对与六应丸具有相似组分的六神丸, 同样也适用于此法。

牛黄消炎丸中除含有上述二种药中的组分外, 还含有在可见区有较大吸收的大黄和青黛, 用上述同样的方法对大黄和青黛进行考察, 结果见表 1。

Tab 1 . Absorbances of rhubarb and natural indigo solution

	Rhubarb	Natural indigo
Sample weight (mg)	38.95	37.40
$A_1$	0.582	0.102
$A_2$	0.580	0.094
$\Delta A$	0.002	0.008

从  $\Delta A$  数值可看出, 大黄和青黛的提取物基本不受光照影响, 不干扰牛黄消炎丸中胆红素的测定。

#### 六. 加样回收率试验

精密称取一定量样品于 10 ml 带塞试管中, 准确加入 1 ml 胆红素贮备液 (40  $\mu\text{g/ml}$ ) 和 10 ml 冷酸性氯仿, 冰水浴中振荡 20 min, 过滤, 弃去初滤液, 测滤液光照前后的  $\Delta A$ , 并同

时测定标准液的  $\Delta A$ , 用比较法计算胆红素的回收率, 结果见表 2。

Tab 2. The recovery test (n=5)

Sample	Added ( $\mu\text{g}$ )	Found ( $\mu\text{g}$ )	Recovery (%)	CV (%)
Liuying pills	40.0	39.5	98.8	1.8
Liushen pills	40.0	40.3	100.7	2.2
Niuhuang Xiaoyan pills	40.0	37.2	93.0	1.1

## 七. 样品测定

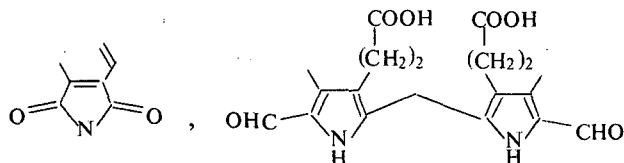
精密称取六应丸、六神丸各60 mg, 牛黄消炎丸 120 mg 置于 10 ml 带塞试管中, 准确加入冷酸性氯仿 10 ml, 按回收率项下操作, 结果见表 3。

Tab 3. Analysis of samples

Sample	Factory	Batch No.	Bilirubin (mg/g)				Average (mg/g)	CV (%)
Liuying pills	A	1	1.11	1.17	1.17	1.16	1.15	2.5
		2	1.14	1.16	1.14	1.10	1.14	2.2
		3	0.836	0.823	0.828	0.829	0.829	0.6
Liushen pills	B	1	0.907	0.900	0.906	0.898	0.903	0.5
		2	0.993	0.994	1.00	1.01	0.999	0.6
		3	0.608	0.599	0.576	0.584	0.592	2.5
Niuhuang Xiaoyan pills	E	1	0.607	0.590	0.584	0.583	0.591	1.9
		2	0.650	0.649	0.645	0.636	0.645	1.0
		3	0.494	0.482	0.471	0.501	0.487	2.7

## 讨 论

一. 胆红素光氧化机理 胆红素光氧化的产物及反应机理比较复杂。其分子结构由二个双吡咯共轭体系通过次甲基相连构成, 经光氧化生成胆绿素以及其它一些小分子化合物, 如



等。Bonnett<sup>(6)</sup>提出了胆红素在氯仿中

经光氧化产生胆绿素的反应机理: 在可见光照射下, 胆红素首先由基态(I)变成激发态单线态(II)和激发态三线态(III)(见图 3), 然后失去氢游离基, 生成游离基(IV), 其结构为共振稳定体系, 该游离基在氧及 RH 的存在下, 生成中间体(V), 进一步消去  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 得共轭体系更长的胆绿素(VI)。

二. 光照条件 胆红素标准液的光氧化反应, 曾试用各种光源, 如太阳光(照度约 60000LX)、室内日光(照度约 450 lx)、红外灯(照度约 7000 lx)、254 nm 或 365 nm 紫外灯等, 试验结果表明: 太阳光变化最迅速, 红外灯其次, 紫外灯下照射吸收度变化不大, 在室内日光下放置一天, 溶液由黄变绿直至浅蓝色。从上述几种光源试验表明, 光强度主要影响氧化反应速度, 而最后产物均为浅蓝色, 故光强度不影响  $\Delta A$  值。

三. 胆红素贮备液的稳定性 胆红素见光易氧化变色, 胆红素溶液低温避光保存较稳

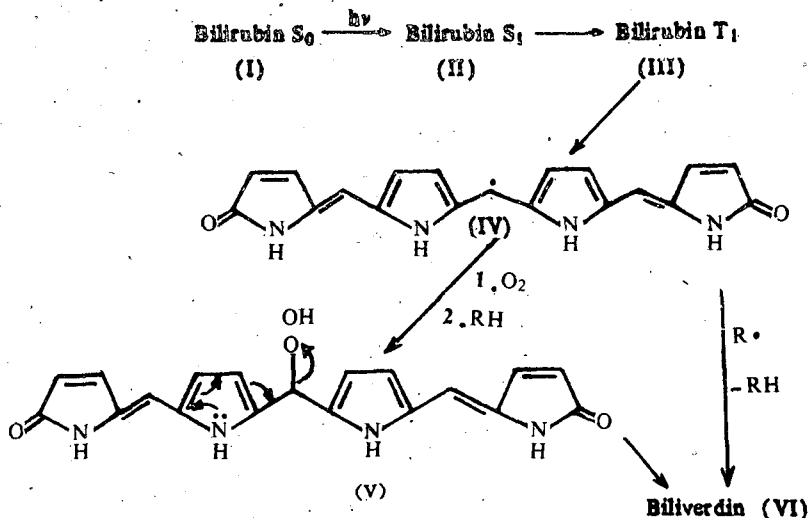


Fig 3. The mechanism of photo-oxidation for bilirubin.

定。作者对胆红素氯仿贮备液的稳定性进行了考察，每天吸取2 ml 贮备液于 10 ml 容量瓶中，用该溶剂稀释至刻度，测其吸收度，一周内吸收度基本不变。

四.  $\Delta A$  的测定方法 标准液及样品液的  $\Delta A$  可按本文上述方法，以溶剂为空白，分别测其光照前后的吸收值，相减得  $\Delta A$ ；也可以光照前后的溶液分别为样品液和参比液，直接测其  $\Delta A$ ，后者测定更为方便。本文在建立方法时，需考察  $A_2$  值的数值及稳定性，方法的重现性等，故本文数据以前者方法所得。

### 参 考 文 献

1. 王亮明, 等. 胆红素含量测定方法的改进. 中成药研究 1988; 4: 9.
2. 韩成泰, 韩来敏. 人工培植牛黄中主要成分的薄层色谱扫描法. 药理学报 1986; 21: 864.
3. 倪仲仪, 等. 六应丸中牛黄有效成分的薄层扫描. 中国药科大学学报 1989; 20: 100.
4. Merck Index. Tenth ed. 1983: 1222.
5. 胡良才, 王翔林. 人工牛黄中胆红素的稳定性研究. 中成药研究 1986; 9: 10.
6. Bonnett R. Mechanisms of the photodegradation of bilirubin. Biochem Soc Trans 1976; 4: 222.

## ASSAY OF BILIRUBIN OF OX GALLSTONE IN CHINESE PATENT MEDICINES BY DIFFERENTIAL SPECTROPHOTOMETRY

KY Ni, SZ Tu, B Yu and LL Zheng

(China Pharmaceutical University, Nanjing 210009)

**ABSTRACT** This paper describes that the absorption spectrum of bilirubin solution was changed obviously by photo-oxidation. The absorbance was measured at 453 nm before and after light irradiation. The

contents of bilirubin of ox gallstone in Liuying pills, Liushen pills and Niu Huang Xiaoyan pills were determined by differential absorbance ( $\Delta A$ ). Calibration graph was linear in the range of 1.6 ~ 8.0  $\mu\text{g/ml}$  for  $\Delta A$ . The average recoveries for three Chinese patent medicines were over 93%. Determinations of bilirubin in Chinese patent medicines were not affected by other components.

**Key words** Bilirubin; Liuying pills; Liushen pills; Niu Huang Xiaoyan pills; Differential spectrophotometry