

# 甲基紫三波长叠加共振光散射法测定 酒石酸泰乐菌素的含量

袁莉<sup>1,2</sup>, 刘毅<sup>1,2</sup>, 储文<sup>1,2</sup>, 袁嘉怡<sup>1,2</sup>, 马卫兴<sup>1,2,3\*</sup>

(1.江苏海洋大学药学院,江苏连云港222005;  
2.江苏海洋大学生物医药产业学院,江苏连云港222005;  
3.江苏省海洋药物筛选重点实验室,江苏连云港222005)

**摘要:**在 Clark-Lubs 缓冲溶液中,基于酒石酸泰乐菌素与阳离子甲基紫试剂发生电荷转移反应,建立了三波长叠加共振光散射法(TRLS)测定酒石酸泰乐菌素含量的新方法。研究发现,在实验条件下,共振光散射图谱中会产生3个特征散射峰,分别在322、510、628 nm。在322、510、628 nm处,酒石酸泰乐菌素的质量浓度都在0.04~0.2 mg/L内呈线性关系;相关系数分别为0.999 4、0.999 5、0.999 2;检出限分别为0.036、0.040、0.038 mg/L。而采用三波长叠加法测定时,酒石酸泰乐菌素的质量浓度在0.04~0.2 mg/L内呈线性关系,相关系数为0.999 9,检出限为0.013 mg/L,检出限为单波长检测法的3倍。因建立的 TRLS 新方法简便、省时、灵敏度高,故可用于酒石酸泰乐菌素含量的大批量检测。

**关键词:**酒石酸泰乐菌素;甲基紫(MV);三波长叠加共振光散射法(TRLS);电荷转移反应

**中图分类号:** O657.39

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0253-4320(2023)03-0235-05

**DOI:** 10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2023.03.044

## Determination of tylosin tartrate by three-wavelength superimposed resonant light scattering method with methyl violet

YUAN Li<sup>1,2</sup>, LIU Yi<sup>1,2</sup>, CHU Wen<sup>1,2</sup>, YUAN Jia-yi<sup>1,2</sup>, MA Wei-xing<sup>1,2,3\*</sup>

(1.School of Pharmacy, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China;  
2.School of Biomedical Industry, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China;  
3.Jiangsu Provincial Key Laboratory of Marine Drug Screening, Lianyungang 222005, China)

**Abstract:** In Clark-Lubs buffer solution, a novel three-wavelength superimposed resonance light scattering (TRLS) method for measuring the content of tylosin tartrate is established based on the charge transfer reaction between tylosin tartrate and cationic methyl violet reagent. It is found that under experimental conditions, three characteristic scattering peaks will appear in the resonance light scattering spectrum at 322 nm, 520 nm and 628 nm, respectively. At 322 nm, 510 nm, and 628 nm, the mass concentration of tylosin tartrate shows linear relationship within 0.04–0.2 mg·L<sup>-1</sup>, with correlation coefficients of 0.999 4, 0.999 5, and 0.999 2, respectively, and detection limits of 0.036 mg·L<sup>-1</sup>, 0.040 mg·L<sup>-1</sup> and 0.038 mg·L<sup>-1</sup>, respectively when single-wavelength detection method is employed. When three-wavelength superimposed method is employed, the mass concentration of tylosin tartrate shows a linear relationship within the range of 0.04–0.2 mg·L<sup>-1</sup>, with a correlation coefficient of 0.999 9, and a detection limit of 0.013 mg·L<sup>-1</sup> that is one third that by single-wavelength detection method. The newly established TRLS method is simple, time-saving and highly sensitive, so it can be used for mass detection of tylosin tartrate content.

**Key words:** tylosin tartrate; methyl violet; three-wavelength superimposed resonant light scattering method (TRLS); charge transfer reaction

酒石酸泰乐菌素是一种大环内酯类动物抗生素,杀菌作用机理主要为阻断细菌蛋白质的合成<sup>[1]</sup>。酒石酸泰乐菌素吸收快、排泄迅速且在体内无残留,因此在临床上应用广泛。尤其是对革兰氏阳性菌和支原体引起的感染有着特殊的作用<sup>[2]</sup>。因为它对胸膜肺炎放线杆菌有特别高的活性,因此是治疗由支原体引起的畜禽慢性呼吸道疾病的首选药物<sup>[3]</sup>。目前国内外已有检测酒石酸泰乐菌素含量的方法有 HPLC 法<sup>[4]</sup>、紫外分光光度法<sup>[5]</sup>等。

甲基紫,属于碱性三苯甲烷类染料,在水溶液中以阳离子形式存在<sup>[6]</sup>。现已被用于测定红霉素<sup>[7-8]</sup>、阿莫西林<sup>[9-10]</sup>、利福平<sup>[11]</sup>,还被用于在生物方面检测 RNA<sup>[12]</sup>,但至今未被用于检测酒石酸泰乐菌素。实验研究发现,甲基紫之间依靠氢键在波长为 322、510、628 nm 处产生 3 个强烈的共振光散射信号峰的超分子聚集体,酒石酸泰乐菌素的加入与阳离子染料甲基紫发生电荷转移反应形成电荷转移配合物导致共振光散射强度减弱。由于散射强度

收稿日期:2022-04-20;修回日期:2023-01-01

基金项目:江苏省品牌专业二期工程(省特色专业-药物制剂,编号65);2021年江苏省首批一流本科课程(线下一流课程-药物分析,序号104)

作者简介:袁莉(1998-),女,硕士生;马卫兴(1965-),男,博士,教授,研究方向为应用化学和药物分析,通讯联系人,3025483196@qq.com。

$I_{\text{RLS}}$ 具有加和性,因此本文中建立了甲基紫三波长叠加共振光散射技术测定酒石酸泰乐菌素含量的新方法。

## 1 实验部分

### 1.1 实验仪器与试剂

F-7000 型荧光分光光度计,日本日立公司;BS210S 型电子天平,北京赛多利斯天平有限公司;pHS-3D 型酸度计,中国上海高致精密仪器有限公司。

甲基紫(分析纯,  $2 \times 10^{-4}$  mol/L,天津市登峰化学试剂厂);邻苯二甲酸氢钾(分析纯,0.1 mol/L,国药集团化学试剂有限公司);氢氧化钠(分析纯,0.1 mol/L,国药集团化学试剂有限公司);盐酸(分析纯,0.1 mol/L,南京化学试剂股份有限公司);实验用水为去离子水。

100.0 mg/L 酒石酸泰乐菌素标准储备液制备:称取 100.0 mg 酒石酸泰乐菌素于 1 000 mL 容量瓶中,加水溶解并且定容,即得到 100.0 mg/L 标准溶液。使用时将溶液稀释成 2.0 mg/L 的标准溶液。

### 1.2 实验方法

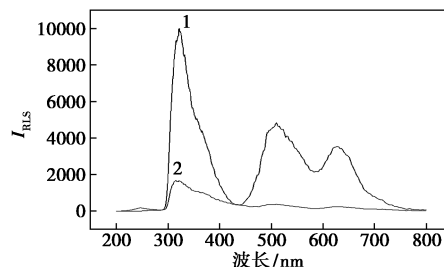
在 10 mL 比色管中加入适量的 2.0 mg/L 酒石酸泰乐菌素溶液、0.80 mL pH 3.2 的 Clark-Lubs 缓冲溶液、0.90 mL 的甲基紫溶液( $2 \times 10^{-4}$  mol/L),加去离子水定容至刻度线,摇匀后置于荧光分光光度计中,将狭缝设置为 5.0 nm,发射波长和激发波长都设为 322、510、628 nm,进行扫描得到空白溶液的散射强度  $I_0$ ,测定溶液的散射强度  $I$ ,计算得出两者的共振光散射强度差值  $\Delta I_{\text{RLS}} = I_0 - I$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 光谱特征

在“1.2 实验方法”项下,扫描 200~800 nm 范围内的共振光散射图谱,如图 1 所示。空白溶液(曲线 1)引起强烈的共振光散射现象,但随酒石酸泰乐菌素溶液的加入(曲线 2),体系的共振光散射强度减弱,分别在波长 322 nm 处出现最大的特征峰,其次是在 510 nm 和 628 nm 出现次大特征峰。这是因为酒石酸泰乐菌素在实验条件下,以泰乐菌素形式存在,分子结构上具有带孤对电子的叔胺,可作为电子给予体与阳离子染料甲基紫电子受体试剂发生反应,生成电荷转移配合物,从而使得体系共振光散射信号减弱。研究发现,波长在 322、510、

628 nm 处时,体系的共振光散射强度差值达到最大,故实验选用 322、510、628 nm 为检测波长。由于散射强度  $I_{\text{RLS}}$ 具有加和性,因此采用三波长叠加检测法进行测定。



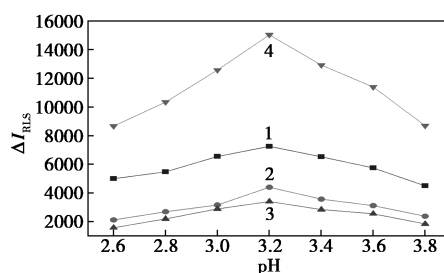
1—空白溶液;2—测定溶液

图 1 共振光散射图谱

### 2.2 实验条件的优化

#### 2.2.1 pH 的影响

分别考察了 Britton-Robinson、HAc-NaAc、Clark-Lubs 等不同缓冲溶液对体系共振光散射强度值的影响,研究发现,在 Clark-Lubs 缓冲溶液中,体系的共振光散射强度差值最大,故选择 Clark-Lubs 缓冲溶液。对 pH 2.4~3.8 范围的 Clark-Lubs 缓冲溶液进行测定,结果如图 2 所示。不论波长为 322 nm 时,还是波长为 510 nm 和 628 nm 时,pH 3.2 的 Clark-Lubs 缓冲溶液的散射强度差值  $\Delta I_{\text{RLS}}$  都为最大。当采用三波长叠加检测法(TRLS)测定时,灵敏度要高于单波长检测法(SRLS),故实验选用 pH 3.2 的 Clark-Lubs 缓冲溶液。



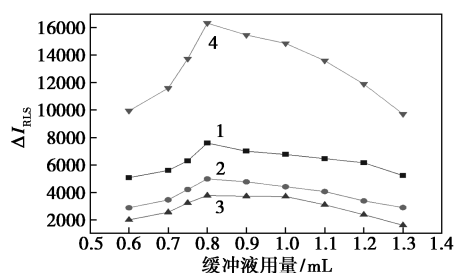
1—检测波长 322 nm;2—检测波长 510 nm;  
3—检测波长 628 nm;4—检测波长(322+510+628) nm

图 2 不同 pH 的 Clark-Lubs 缓冲溶液对体系共振光散射强度的影响

#### 2.2.2 缓冲溶液的影响

考察了体积在 0.60~1.30 mL 范围的 Clark-Lubs 缓冲溶液对体系共振光散射强度的影响,结果如图 3 所示。当波长为 322、510、628 nm 时,pH 3.2 的 Clark-Lubs 缓冲溶液的体积在 0.80 mL 的共振光散射强度差值  $\Delta I_{\text{RLS}}$  最大,且三波长叠加检测法

(TRLS)灵敏度高于单波长检测法(SRLS),故选用0.80 mL pH 3.2的Clark-Lubs缓冲溶液。

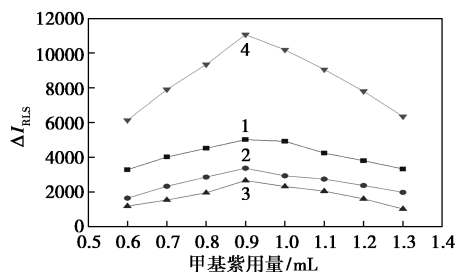


1—检测波长 322 nm; 2—检测波长 510 nm;  
3—检测波长 628 nm; 4—检测波长 (322+510+628) nm

图3 Clark-Lubs缓冲溶液的用量  
对体系共振光散射强度的影响

### 2.2.3 甲基紫的影响

甲基紫是整个体系中最重要反应试剂,决定着整个体系反应的进行,因此其用量对体系有着重要的影响,故考察了体积在0.60~1.30 mL范围对共振光强度的影响。如图4所示,三波长叠加检测法(TRLS)的灵敏度优于单波长检测法(SRLS),并且在波长为322、510、628 nm时,体积在0.90 mL的甲基紫溶液的共振光散射强度差值 $\Delta I_{RLS}$ 最大。故本研究选用0.90 mL的甲基紫溶液为最佳用量。



1—检测波长 322 nm; 2—检测波长 510 nm;  
3—检测波长 628 nm; 4—检测波长 (322+510+628) nm

图4 阳离子染料甲基紫用量  
对体系共振光散射强度的影响

### 2.2.4 试剂加入顺序的影响

考察了酒石酸泰乐菌素、Clark-Lubs缓冲溶液以及甲基紫3种溶液不同的加入顺序对体系共振光散射强度的影响。实验研究表明,不管是采用三波长叠加检测法(TRLS)还是单波长检测法(SRLS),试剂加入的顺序为:酒石酸泰乐菌素溶液、Clark-Lubs缓冲溶液、甲基紫溶液时,体系的散射强度差值最大,故本实验选用此顺序。

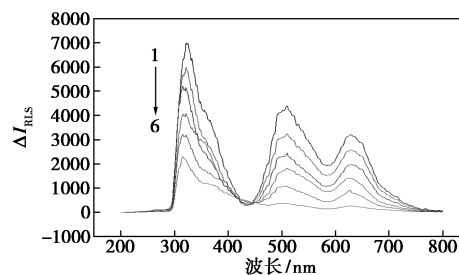
### 2.2.5 反应时间的影响

在室温下,对体系反应时间进行了考察,反应时

间为0~45 min。通过对有规律的时间间隔进行测定,不论选用单波长检测法(SRLS),还是三波长叠加检测法(TRLS),反应时间都在0 min时刻,体系的共振光散射强度差值 $\Delta I_{RLS}$ 最大,此时间后就呈下降趋势。故选择反应时间为0 min,即溶液即配即测,与其他方法相比,该方法大大节省了时间的消耗。

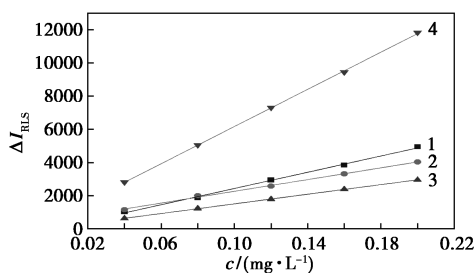
### 2.3 工作曲线与检出限

确定了所有最佳的条件,准确移取不同体积的浓度为2.0 mg/L酒石酸泰乐菌素溶液,在“1.2实验方法”项下,测定共振光散射图谱,得到图5。根据得到的空白溶液的共振光散射强度 $I_0$ 和测定溶液的共振光散射强度 $I$ ,计算出两者的共振光散射差值 $\Delta I_{RLS}$ 。以酒石酸泰乐菌素溶液的质量浓度 $C$ 为横坐标,共振光散射差值 $\Delta I_{RLS}$ 为纵坐标,绘制出工作曲线如图6所示。



1—空白溶液; 2—0.04 mg/L; 3—0.08 mg/L;  
4—0.12 mg/L; 5—0.16 mg/L; 6—0.20 mg/L

图5 不同浓度酒石酸泰乐菌素溶液的  
共振光散射光图谱



1—检测波长 322 nm; 2—检测波长 510 nm;  
3—检测波长 628 nm; 4—三波长叠加法

图6 不同浓度酒石酸泰乐菌素溶液的工作曲线

选择单波长检测法时:当波长为322 nm时,酒石酸泰乐菌素的质量浓度在0.04~0.2 mg/L内呈线性关系,线性回归方程为 $\Delta I_{RLS} = 23\,993C + 25.5$ , $R = 0.9994$ ,检出限为0.036 mg/L;当波长为510 nm,酒石酸泰乐菌素的质量浓度在0.04~0.2 mg/L内呈线性关系,线性回归方程为 $\Delta I_{RLS} = 17\,822C +$

469.74,  $R=0.9995$ , 检出限为 0.040 mg/L; 当波长为 628 nm 时, 酒石酸泰乐菌素的质量浓度在 0.04~0.2 mg/L 内呈线性关系, 线性回归方程为  $\Delta I_{RLS} = 14243C + 68.52$ ,  $R=0.9992$ , 检出限为 0.038 mg/L。

选用 322、510、628 nm 处的共振光散射强度差值进行三波长叠加法检测时, 酒石酸泰乐菌素的质量浓度在 0.04~0.2 mg/L 内呈线性关系, 线性回归方程为  $\Delta I_{RLS} = 56057C + 563.76$ ,  $R=0.9999$ , 检出限为 0.013 mg/L。研究表明, 三波长叠加检测法的灵敏度约是单波长检测法灵敏度的 3 倍。

### 2.4 回收率实验

依据处方, 精密称量酒石酸泰乐菌素模拟可溶性粉适量, 置于 1 000 mL 的容量瓶中, 加去离子水定容至刻度, 摇匀备用。准确移取该溶液 1.00 mL, 在“1.2 实验方法”项下进行平行测定 10 次 ( $n=10$  次), 得到的结果如表 1 所示。酒石酸泰乐菌素的回收率在 99.55%~100.90%, 平均回收率为 100.10%,  $RSD=0.42\%$ 。因相对偏差  $RSD$  值  $\leq \pm 5\%$ , 说明该结果符合药物分析的实际工作要求。

表 1 酒石酸泰乐菌素的回收率实验结果

波长/nm	次数	浓度/ (mg·L <sup>-1</sup> )	测定 浓度/ (mg·L <sup>-1</sup> )	回收率/ %	平均 回收 率/%	RSD/ %
三波长叠加法 (322、510、 628 nm)	1	0.20	0.2018	100.90	100.10	0.42
	2	0.20	0.2005	100.25		
	3	0.20	0.1998	99.88		
	4	0.20	0.1995	99.76		
	5	0.20	0.2001	100.05		
	6	0.20	0.1993	99.67		
	7	0.20	0.2010	100.48		
	8	0.20	0.2000	99.99		
	9	0.20	0.1991	99.55		
	10	0.20	0.2009	100.44		

### 2.5 共存物质的影响

考虑到样品中会存在许多共存物质, 可能会对本实验造成干扰。于是本实验在室温下考察了一些

常见物质对体系共振光散射强度的影响(计算得到的结果相对误差  $\leq \pm 5\%$ , 说明无干扰)。

实验研究发现, 50 倍的 L-谷氨酸、甘氨酸, 80 倍的 L-胱氨酸、山梨酸、丝氨酸, 100 倍的 K<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>、Na<sup>+</sup>、F<sup>-</sup>、Mg<sup>2+</sup>, 150 倍的硬脂酸镁、苯甲酸钠, 200 倍的蔗糖、葡萄糖、可溶性淀粉均对酒石酸泰乐菌素没有干扰。

### 2.6 样品分析

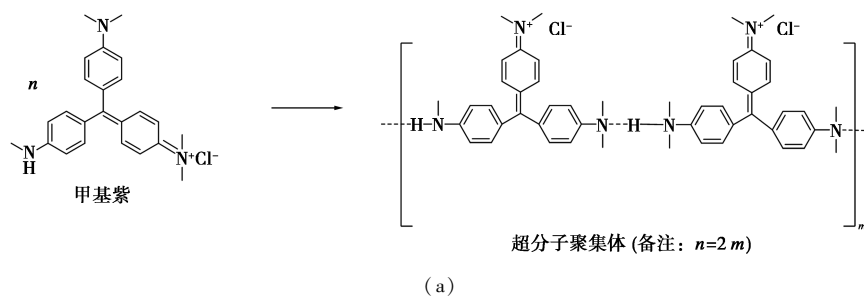
精密称量市面上销售的注射用酒石酸泰乐菌素 0.1000 g(标示量为 2 g/瓶), 置于 1 000 mL 容量瓶中, 加去离子水定容至刻度, 得到酒石酸泰乐菌素原样溶液。将原样溶液稀释 50 倍得到待测样品溶液。根据本实验方法平行测定 6 次共振光散射强度, 计算出注射用酒石酸泰乐菌素的含量和 RSD, 如表 2 所示。与紫外分光光度法<sup>[5]</sup>对比, 2 种方法得出的结果基本一致。

表 2 样品中酒石酸泰乐菌素含量的分析结果

样品	本法(TRLIS 法)			紫外分光光度法		
	平均 测定值/ (g·瓶 <sup>-1</sup> )	相对于标 示量的平 均含量/%	RSD/ %	平均 测定值/ (g·瓶 <sup>-1</sup> )	相对于标 示量的平 均含量/%	RSD/ %
1	1.998	99.92	0.57	2.000	99.98	1.98
2	1.997	99.86	0.64	1.995	99.73	1.21

### 3 反应机理

在实验条件下, 溶液中只存在甲基紫时会引起强烈的共振光散射现象, 这是由于阳离子甲基紫分子之间依靠氢键作用构筑形成了超分子聚集体, 从而引起强烈的共振光散射现象, 如图 7(a)。但随着不同浓度酒石酸泰乐菌素的加入, 共振光散射强度会随之减弱, 这是因为甲基紫分子之间依靠氢键作用构筑的超分子聚集体被破坏, 转而依靠静电引力作用与酒石酸根发生反应生成离子缔合物。而酒石酸泰乐菌素此时是以泰乐菌素分子形式存在, 因泰乐菌素上具有带孤对电子的叔胺, 所以可作为电



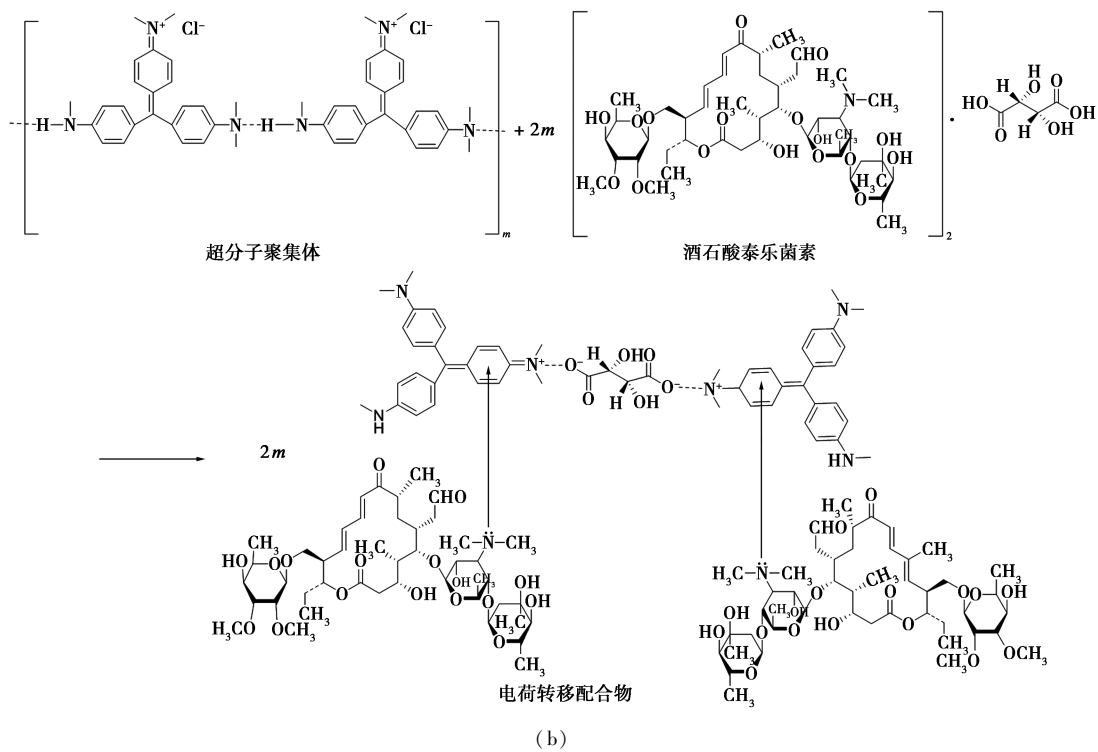


图7 反应机理

子给予体,与甲基紫和酒石酸形成的离子缔合物(电子接受体试剂)发生电荷转移反应,生成电荷转移配合物,如图7(b)所示,因为生成了电荷转移配合物而破坏了体系中甲基紫分子之间依靠氢键而构筑的超分子聚集体,从而导致体系的共振光散射信号强度减弱。

#### 4 结论

在pH 3.2的Clark-Lubs缓冲溶液中,甲基紫分子之间依靠氢键形成了超分子聚合物,引起强烈的共振光散射现象;在实验条件下,与酒石酸泰乐菌素发生反应生成电荷转移配合物,破坏了超分子聚合物,导致共振光散射强度减弱,并产生3个特征散射峰。因 $I_{\text{RLS}}$ 具有加和性,故首次建立了三波长叠加共振光散射光谱法测定酒石酸泰乐菌素含量的新方法。该方法具有选择性好、灵敏度高,且用于检测实际药物也取得了满意的结果,故可适用于酒石酸泰乐菌素大批量的检测。

#### 参考文献

- [1] 尹川,胡国强.大环内脂类抗生素的临床疗效[J].解放军药学学报,1999,15(4):30-31.
- [2] 司良.大环内脂类抗生素的作用机制与应用进展[J].现代预防医学,2010,37(22):4397-4398.
- [3] Li Gaixia, Liu Baosheng, Han Rong, *et al.* A fluorescence spectroscopic study of the reaction mechanism of Tylosin Tartrate with Lysozyme[J]. BioTechnology: An Indian Journal, 2014, 10(24): 198-205.
- [4] 刘红云,郑举.HPLC法测定酒石酸泰乐菌素可溶性粉的含量[J].兽药与饲料添加剂,2003,8(3):33-34.
- [5] 于伟,顾文松.紫外分光光度法测定酒石酸泰乐菌素及其可溶性粉含量[J].兽药与饲料添加剂,2009,14(5):28-29.
- [6] 刘绍璞,龙秀芬,胡小莉,等.核酸某些碱性三苯甲烷染料体系的RRS及其分析应用[J].西南师范大学学报:自然科学版,2001,26(2):164-169.
- [7] 徐婉珍,李春香,阎永胜.分光光度法测定红霉素——基于与甲基紫的荷移反应[J].理化检验:化学分册,2007,43(12):1073-1075.
- [8] 陈莲惠,简易,曹洪斌.甲基紫光度法测定红霉素肠溶片中的红霉素[J].中国测试,2013,39(4):58-60.
- [9] 段慧,刘忠芳,胡小莉,等. $\text{KIO}_3$ -溴化钾-甲基紫体系共振瑞利散射法测定青霉素类抗生素[J].西南大学学报:自然科学版,2008,30(5):31-35.
- [10] 庞向东,刘艳,邓钦心,等.甲基紫褪色光度法测定阿莫西林的含量[J].理化检验:化学分册,2011,47(8):982-983,990.
- [11] 江虹,刘艳,庞向东.甲基紫探针分光光度法测定利福平[J].化学研究与应用,2013,25(9):1286-1289.
- [12] 司文会,訾言勤.核糖核酸与甲基紫作用机理及含量测定的研究[J].光谱学与光谱分析,2005,25(11):1846-1849. ■