

赵莎莎, 程星星, 龚佳豪, 等. 猪血浆中替米考星高效液相色谱检测方法的建立 [J]. 畜牧与兽医, 2026, 58 (2): 56-60.

ZHAO S S, CHENG X X, GONG J H, et al. Development of a high-performance liquid chromatography method for the quantification of tilmicosin in porcine plasma [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2026, 58 (2): 56-60.

猪血浆中替米考星高效液相色谱检测方法的建立

赵莎莎^{1#}, 程星星^{2#}, 龚佳豪², 汪宇涵², 赵源², 司星星²,
张梦醒², 魏经阁², 高修歌², 郭大伟^{2*}

(1. 江苏农牧科技职业学院, 江苏 泰州 225300;

2. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210014)

摘要: 旨在建立一种用于猪血浆中替米考星含量的高效液相色谱 (high-performance liquid chromatography, HPLC) 检测方法。制备含替米考星标准品的健康仔猪血浆样品, 用甲醇提取和氯仿萃取, 使用 Agilent ZOR BAX Eclipse XDB-C18 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 洗脱, 外标法定量分析。结果: 方法学验证显示, 替米考星在 0.15~50 μg/mL 的浓度范围内, 呈线性 ($y=9\ 956.3x-798.18$, $R^2=0.999$), 日内与日间精密度分别为 0.30%~2.46%、1.25%~4.78%, 回收率为 85.37%~118.45%。结论: 该方法特异性强、灵敏度高、重复性好, 适用于猪血浆中替米考星的含量测定。

关键词: 替米考星; 高效液相色谱; 血浆; 猪; 外标法

中图分类号: S859 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2026)02-0056-05

Development of a high-performance liquid chromatography method for the quantification of tilmicosin in porcine plasma

ZHAO Shasha^{1#}, CHENG Xingxing^{2#}, GONG Jiahao², WANG Yuhan², ZHAO Yuan², SI Xingxing²,
ZHANG Mengxing², WEI Jingge², GAO Xiuge², GUO Dawei^{2*}

(1. Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China;

2. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210014, China)

Abstract: To develop a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for quantifying tilmicosin in porcine plasma, tilmicosin standards were spiked into plasma samples obtained from healthy piglets, followed by extraction with methanol and chloroform. Chromatographic separation was achieved on an Agilent ZOR BAX Eclipse XDB-C18 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) under gradient elution conditions, with quantification performed via an external standard calibration curve. The results were that method validation exhibited excellent linearity ($R^2=0.999$) across the concentration range of 0.15-50 μg/mL, as described by the regression equation $y=9\ 956.3x-798.18$. The intra-day and inter-day precision values were 0.30%-2.46% and 1.25%-4.78%, respectively, with recovery rates ranging from 85.37% to 118.45%. In conclusion, the above results indicated that the present method showed superior specificity, sensitivity and reproducibility, confirming its appropriate application to the accurate determination of tilmicosin in porcine plasma.

Keywords: tilmicosin; HPLC; plasma; pigs; external standard method

替米考星是一种半合成大环内酯类动物专用抗生素, 对绝大多数革兰阳性菌与部分革兰阴性菌具有高效抗菌活性, 如多杀性巴氏杆菌、溶血性巴氏杆菌、猪胸膜肺炎放线杆菌等^[1-2]。此外, 替米考星对支原

体也具有较强的抑制作用。临床上, 替米考星常被用于治疗猪、牛与羊的呼吸道感染^[3-5], 尤其是猪的胸膜肺炎、支原体肺炎和出血性败血症等^[3,6-7]。目前, 国内外学者利用高效液相色谱 (high-performance liquid chromatography, HPLC) 法对替米考星原料药及其相关制剂在猪体内的药动学特征进行了报道。然而, 大多数报道所涉及的猪血浆样品前处理较为复杂, 并影响了检测方法学的准确度^[2,8-10]。因此, 建立简单且准确的猪血浆中替米考星的 HPLC 检测方法尤为必要, 也对人类健康和食品安全具有重要意义。

收稿日期: 2025-04-07; 修回日期: 2025-11-24

基金项目: 江苏农牧科技职业学院科技项目 (NSF2024ZR03)

第一作者: 赵莎莎, 女, 本科, 高级实验师; 程星星, 女, 硕士, 见习兽医师。#共同第一作者

*通信作者: 郭大伟, 教授, 主要从事新兽药创制研究, E-mail: gdawei0123@njau.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

替米考星对照品, 购自中国兽医药品监察所; 替米考星原料药, 购自宁夏泰瑞制药公司; HPLC 级甲醇和四氢呋喃, 均购自美国 TEDIA 公司; HPLC 级乙腈, 购自上海 Aladdin 公司; 85% 磷酸, 购自西陇科学股份公司。

替米考星对照品储备液: 精确称取替米考星对照品 10 mg, 以乙腈溶解并超声, 配制成 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 替米考星对照品储备液。

磷酸二丁胺缓冲盐溶液: 取 11.8 mL 磷酸 (85%) 稀释至 100 mL, 得到 10% 磷酸。取 70 mL 磷酸溶液 (10%) 于烧杯中, 加入 16.8 mL 二丁胺, 充分搅拌混匀后, 用 85% 磷酸调节 pH 值至 2.5, 定容至 100 mL。

磷酸溶液: 取 5.71 g 磷酸, 加 900 mL 超纯水用 12.5 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 2.5, 加超纯水定容至 1 000 mL。

1.2 主要仪器

HPLC 仪 (e2695, 配备 e2489 紫外检测器), 美国 Waters 公司; 超声清洗机, 南京先欧仪器制造公司; 氮吹仪, 恒奥科技发展有限公司; 台式自动平衡离心机, 湖南湘立科学仪器有限公司。

1.3 仔猪血浆

健康三元仔猪, 雌雄各半, 60~70 日龄, 体重 (20 \pm 2) kg, 购自昆山市梅山猪保种有限公司 (生产许可证号: 2023 苏 S000102)。饲养于南京农业大学实验动物中心。动物试验经南京农业大学伦理委员会批准 (审批号: NJAU.No20211227206)。在试验开展前, 仔猪先适应 1 周, 并给予充足的水和饲料。

1.4 试验方法

1.4.1 液相色谱条件

色谱柱: Agilent ZOR BAX Eclipse XDB-C18 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm); 流动相及其体积比为, 水: 乙腈: 四氢呋喃: 磷酸二丁胺缓冲盐溶液 = 80: 12: 5.5: 2.5; 流速, 1.0 mL/min; 检测波长, 280 nm; 柱温, 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量, 10 μL 。

1.4.2 血浆样品的制备

用肝素钠润湿的注射器从前腔静脉采集 5 mL 血液样本, 3 000 r/min 离心 10 min, 收集血浆并于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4.3 血浆样品的前处理

参照文献 [11] 进行血浆样品的前处理。取 0.2 mL 血浆于离心管中, 加入 0.28 mL 甲醇, 涡旋 1 min, 5 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 沉淀

用 0.28 mL 甲醇再次提取, 重复后续操作, 合并 2 次上清液, 用约 1 μL 的 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节其 pH 值; 后向合并的上清液中加入 0.5 mL 三氯甲烷, 涡旋 1 min, 5 000 r/min 离心 10 min, 取下层三氯甲烷, 上层液体用 0.2 mL 三氯甲烷再次提取, 重复后续操作, 合并 2 次三氯甲烷层, 在 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下氮气吹干; 残留物用 0.2 mL 磷酸溶液涡旋复溶, 过 0.22 μm 有机滤膜, 进行 HPLC 检测。

1.4.4 专属性考察

取替米考星对照品工作液、猪空白血浆、含替米考星对照品的空白血浆和待测血浆样品, 血浆样品经“1.4.3”方法前处理后上机检测。根据色谱峰观察血浆样品中替米考星在出峰位置有无杂峰干扰, 进行专属性考察。

1.4.5 血浆标准曲线绘制及灵敏度考察

将替米考星对照品储备液用磷酸溶液稀释后取 20 μL 与 180 μL 空白血浆混匀, 使血浆中替米考星的浓度为 0.15、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 和 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 按照“1.4.3”方法处理后, 进行 HPLC 分析, 根据替米考星的浓度与双峰面积之和, 建立线性关系。根据基线噪音值, 设定替米考星顺式峰的信噪比 (S/N) \geq 3 所对应的药物浓度为检测限 (LOD); 设定 S/N \geq 10 所对应的药物浓度为定量限 (LOQ)。

1.4.6 精密度考察

日内精密度: 设置替米考星低、中、高 (1.0、10.0、50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 3 个浓度, 每个浓度制备 5 个血浆样品平行, 按照“1.4.3”方法处理后, 进行 HPLC 检测, 1 日之内在不同时间点进样 3 次, 记录检测结果, 考察日内精密度。

日间精密度: 同样设置替米考星低、中、高 (1.0、10.0、50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 3 个浓度, 按照“1.4.3”方法处理后, 进行 HPLC 检测, 连续检测 3 d, 记录检测结果, 考察日间精密度。

1.4.7 回收率考察

设置替米考星低、中、高 (1.0、10.0、50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 3 个浓度, 每个浓度制备 3 个血浆样品平行, 按“1.4.3”方法处理后, 进行 HPLC 检测; 将替米考星储备液稀释为低、中、高 (1.0、10.0、50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 3 个浓度, 过 0.22 μm 有机滤膜后, 进行 HPLC 检测。记录检测结果, 绝对回收率 = 血浆样品浓度/实际对照品浓度 \times 100%。

2 结果与分析

2.1 专属性考察

将空白血浆、替米考星对照品工作液、含替米考星对照品的空白血浆、待测血浆样品进行 HPLC 检测

后, 所得色谱见图 1。可见替米考星呈现 2 个色谱峰, 分别为反式异构体和顺式异构体, 其出峰时间在

6.8 和 7.8 min 左右, 在此时段内无血浆杂质及流动相的杂峰, 表明此方法特异性较好。

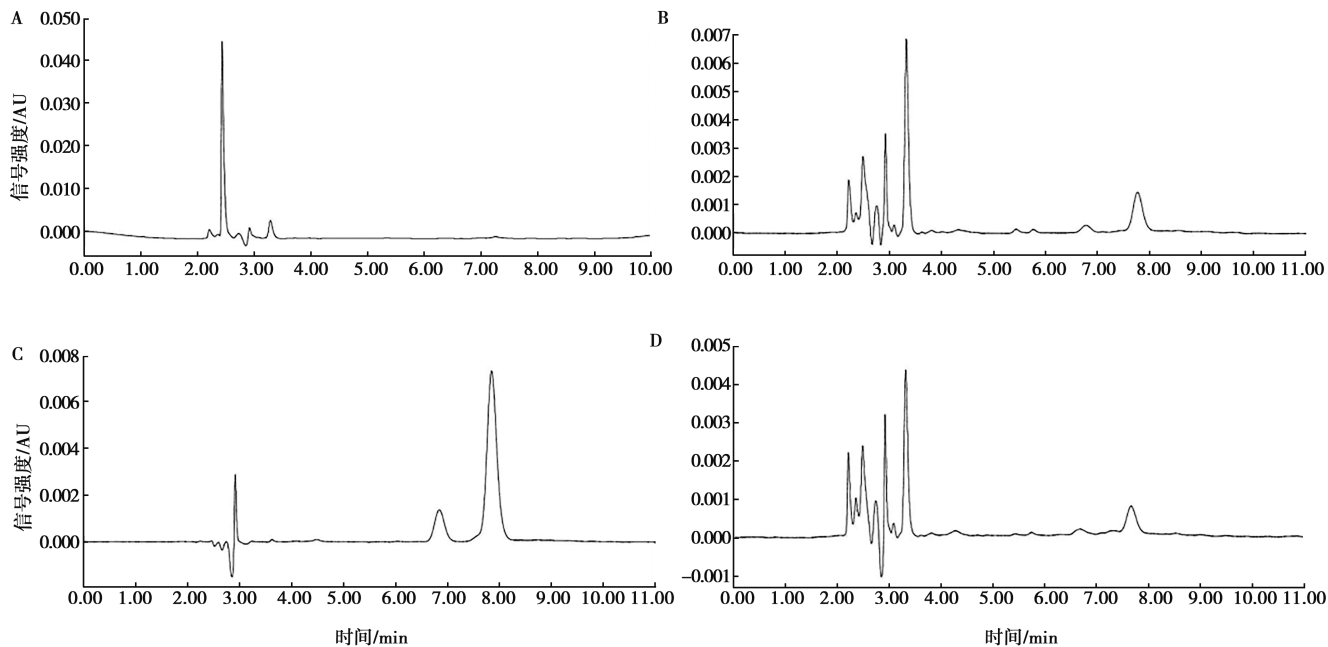


图 1 空白血浆 (A)、含替米考星对照品的空白血浆 (B)、替米考星对照品工作液 (C) 与待测血浆样品 (D) 的色谱

2.2 血浆标准曲线绘制与灵敏度考察

根据图 2 可知, 替米考星浓度在 0.15 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内, 药物浓度与双峰面积之和呈线性关系, 所得方程为 $y = 9\ 956.3x - 798.18$, $R^2 = 0.999$ 。根据基线噪音值, 设定替米考星顺式峰的 $S/N \geq 3$ 所对应的药物浓度为 LOD, 设定 $S/N \geq 10$ 所对应的药物浓度为 LOQ。LOD 为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, LOQ 为 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

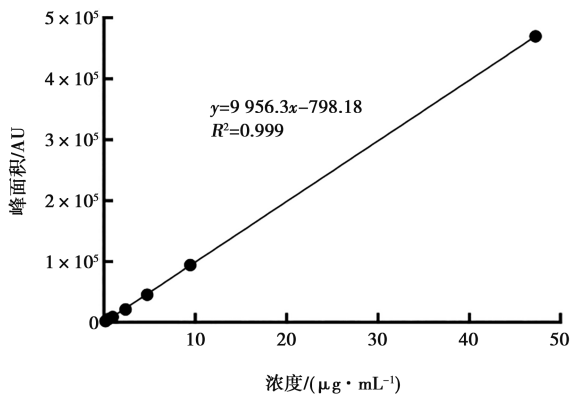


图 2 替米考星在猪血浆中的标准曲线

2.3 精密度考察

所设低、中、高 3 个浓度替米考星的血浆样品, 每个浓度 5 个平行, 所得结果见表 1, 各浓度测定的相对标准偏差均远低于 5%, 表明日内精密度良好。含低、中、高 3 个浓度替米考星的血浆样品分别于

3 d 所测结果见表 2, 各浓度测定的相对标准偏差均低于 5%, 表明日间精密度良好。

表 1 日内精密度试验结果 ($n=5$)

理论浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	不同平行测定浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)					相对标准 偏差/%
	1	2	3	4	5	
1	0.982	0.924	0.953	0.957	0.991	0.30
10	9.531	9.517	9.568	9.548	9.466	0.76
50	46.908	46.966	47.309	47.061	47.156	2.46

表 2 日间精密度试验结果 ($n=3$)

理论浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	不同天数测定浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)			相对标准 偏差/%
	1 d	2 d	3 d	
1	1.362	1.326	1.327	1.25
10	9.317	8.577	9.153	3.52
50	46.722	43.199	48.502	4.78

2.4 回收率考察

将替米考星对照品加入空白血浆, 设置低、中、高 3 个浓度, 经相同处理方法后, 检测血浆样品中替米考星的浓度, 考察试验方法的回收率, 结果见表 3。回收率均在 85.37% ~ 118.45% 之间, 各浓度测定的相对标准偏差均远低于 5%, 表明该方法的回收率良好, 符合方法学要求。

表3 回收率试验结果 (n=3)

理论浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	实际对照品浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	血浆样品浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率/ %	相对标准 偏差/%
		0.98	85.37	
1	1.15	1.36	118.45	2.61
		1.28	111.21	
		9.52	92.38	
10	10.31	9.32	90.37	1.11
		9.29	90.13	
		46.94	88.68	
50	52.93	46.72	88.27	1.35
		48.18	91.02	

3 讨论

目前,生物样品(以组织样品为主^[12])中检测替米考星含量的方法有 HPLC 法、液相色谱-质谱联用法、气相色谱-质谱联用法^[13-14]、表面增强拉曼光谱法^[15]、酶联免疫吸附分析法^[16]等。其中,血浆或血清样品中替米考星含量检测的常用方法为 HPLC 法,相较于其他检测方法,具有成本效益高、方法稳健性强、操作简单等优势。国内外学者均报道了利用 HPLC 法检测替米考星在鸡^[17]、猪^[2,9]、羊^[18-19]、牛^[20]、马^[21]、兔^[22]、鸭^[23]等动物血浆中的含量。

血浆样品的前处理是上机检测前的必经关键步骤,直接影响检测方法的可操作性与回收率等。常用的血浆样品前处理方法有固相萃取法和液-液萃取法等。沈向荣等^[24]与远立国等^[25]利用固相萃取法对血浆样品进行前处理,检测方法的回收率偏低,均在 80%~90%。固相萃取法需要经历活化、平衡、上样、冲洗和洗脱等较多步骤,操作烦琐^[10-11]。而液-液萃取法操作较为简单,研究发现分别选用氯仿/二氯甲烷从血浆中萃取药物 2 次,吸取上清液蒸干后再用流动相复溶,方法的回收率较高(93%~98%)^[26-27],表明萃取方法较好。类似地,本试验也选用氯仿萃取替米考星,离心后收集的上清液用氮吹仪吹干后,再用磷酸溶液复溶,步骤更为简单与便捷。此外,由方法特异性可见,血浆中的杂质吸收峰和替米考星的吸收峰能够明显区分开,出峰时间也较为稳定(6.8 和 7.8 min 左右),检测回收率为 85.37%~118.45%,日内精密密度为 0.30%~2.46%,日间精密密度为 1.25%~4.78%,说明该血浆样品的处理方法和血浆中药物含量测定方法稳定可靠,可用于猪血浆中替米考星含量的测定,为后续研究替米考星及其制剂在猪体内的药动学提供了参考。然而,该检

测方法的回收率与 LOD 相对较低,后续还需进一步通过优化血浆样品前处理方法与检测条件以改善其局限性。

参考文献:

- [1] SCORNEAUX B, SHRYOCK T R. Intracellular accumulation, sub-cellular distribution and efflux of tilmicosin in swine phagocytes [J]. J Vet Pharmacol Ther, 1998, 21 (4): 257-268.
- [2] SHEN J, LI C, JIANG H, et al. Pharmacokinetics of tilmicosin after oral administration in swine [J]. Am J Vet Res, 2005, 66 (6): 1071-1074.
- [3] MOORE G M, BASSON R P, TONKINSON L V. Clinical field trials with tilmicosin phosphate in feed for the control of naturally acquired pneumonia caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida* in swine [J]. Am J Vet Res, 1996, 57 (2): 224-228.
- [4] HOAR B R, JELINSKI M D, RIBBLE C S, et al. A comparison of the clinical field efficacy and safety of florfenicol and tilmicosin for the treatment of undifferentiated bovine respiratory disease of cattle in western Canada [J]. Can Vet J, 1998, 39 (3): 161-166.
- [5] CHRISTODOULOPOULOS G, WARNICK L D, PAPAIOANNOU N, et al. Tilmicosin administration to young lambs with respiratory infection: safety and efficacy considerations [J]. J Vet Pharmacol Ther, 2002, 25 (5): 393-397.
- [6] STIPKOVITS L, MILLER D, GLAVITS R, et al. Treatment of pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, and *Actinobacillus pleuropneumoniae* with various antibiotics [J]. Can J Vet Res, 2001, 65 (4): 213-222.
- [7] MATEUSEN B, MAES D, HOFACK G, et al. A comparative study of the preventive use of tilmicosin phosphate (Pulmotil premix®) and *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination in a pig herd with chronic respiratory disease [J]. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 2001, 48 (10): 733-741.
- [8] MORAN J W, TURNER J M, COLEMAN M R. Determination of tilmicosin in bovine and porcine sera by liquid chromatography [J]. J AOAC Int, 1997, 80 (6): 1183-1189.
- [9] 钱坤, 张浩, 刘学慧, 等. 四种替米考星制剂在猪体内的药代动力学研究 [J]. 天津农业科学, 2021, 27 (8): 36-42.
- [10] 封琦, 张笑意, 吴植, 等. 替米考星颗粒在猪体内的药代动力学研究 [J]. 中国兽药杂志, 2019, 53 (4): 59-64.
- [11] 程星星. 基于纳米结构脂质载体的替米考星乳剂中试放大及其在仔猪中的适口性和药动学研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2022.
- [12] LI B, GONG S Y, ZHOU X Z, et al. Determination of antibacterial agent tilmicosin in pig plasma by LC/MS/MS and its application to pharmacokinetics [J]. Biomed Chromatogr, 2017, 31 (3): e3825.
- [13] 王旭堂. 禽肉、猪肉及禽蛋中替米考星残留气相色谱: 串联质谱检测方法的研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2021.
- [14] TANG Y, WANG X, LU Y, et al. Qualitative and quantitative determination of tilmicosin in poultry eggs by gas chromatography tandem mass spectrometry after derivatization with acetic anhydride

- [J]. Food Chem, 2022, 384: 132572.
- [15] 周润华. 基于 SERS 的鸭血中典型抗生素残留检测方法研究 [D]. 南昌: 江西农业大学, 2024.
- [16] 叶胜强. 泰乐菌素和替米考星单克隆抗体制备及 ELISA 检测试剂盒研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- [17] 张敏敏, 王建兵, 裴琳, 等. 鸡血浆中替米考星 HPLC 检测方法的建立 [J]. 中国家禽, 2016, 38 (12): 21-24.
- [18] 张继瑜, 李建勇, 苗小楼, 等. 替米考星在绵羊体内的药代动力学研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35 (5): 560-564.
- [19] 芮萍. 绵羊血清中替米考星的高效液相色谱检测 [J]. 河北科技师范学院学报, 2004, 18 (3): 15-18.
- [20] 陈柯. 磷酸替米考星在牦牛体内的药物动力学、残留消除规律及药效学研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017 (5): 216-219.
- [21] CLARK C R, DOWLING P M, BOISON J O. Development and validation of a method for determination of tilmicosin residues in equine plasma and tissues using HPLC [J]. J Liq Chromatogr Relat Technol, 2009, 32 (19): 2839-2856.
- [22] 宋丽莉, 孙朋超, 黄维维, 等. 替米考星水溶性粉在家兔体内的药动学研究 [J]. 中国兽医杂志, 2016, 52 (9): 105-108.
- [23] 张楠, 王春梅, 吴海港, 等. 替米考星口服后在肉鸭体内的生物利用度研究 [J]. 实验动物与比较医学, 2010, 30 (1): 48-51.
- [24] 沈向荣, 苏亚楠, 刘彩, 等. 磷酸替米考星在猪体内的药代动力学研究 [J]. 南京农业大学学报, 2013 (5): 126.
- [25] 远立国, 鲍杰, 李成明, 等. 替米考星微球在猪体内的药代动力学研究 [J]. 中国兽医杂志, 2009, 45 (8): 67-68.
- [26] ZHANG L, ZHAO L, LIU Y, et al. Pharmacokinetics of tilmicosin in healthy pigs and in pigs experimentally infected with *Haemophilus parasuis* [J]. J Vet Sci, 2017, 18 (4): 431-437.
- [27] 胡亚南. 氟苯尼考、恩诺沙星及替米考星微囊在猪体内的药物动力学研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2011.

· 信息 ·

倡导健康养殖新理念 解读疫病防控新技术 欢迎订阅 2026 年《畜牧与兽医》

ISSN 0529-5130, CN 32-1192/S

《畜牧与兽医》月刊由教育部主管、南京农业大学主办。1935 年创刊，由原中央大学畜牧兽医系编辑出版，著名兽医学家罗清生教授首任主编。始终遵循“为社会服务，为畜牧生产服务”和“理论与实践相结合，普及与提高并举”的办刊宗旨。本刊连续入选《中文核心期刊要目总览》、“中国科技核心期刊”和“中国农林科技核心期刊”，先后荣获华东地区优秀期刊、江苏期刊方阵双效期刊、全国高校优秀期刊、江苏省高校优秀科技期刊、全国畜牧兽医类优秀期刊等。

读者对象：畜牧、兽医科技工作者和大专院校师生等。

主要内容：主要刊登畜牧、兽医两学科各领域的研究报告、文献综述等。主要栏目有遗传繁育、动物营养、环境卫生、基础兽医、预防兽医、临床兽医和专题综述等。

征订办法：本刊为月刊，大 16 开，定价：28.00 元，全年 12 期共 336.00 元。邮发代号：28-42，全国各地邮局均可订阅。邮局漏订者可直接汇款至本刊杂志社补订。

地 址：江苏省南京市江北新区滨江大道 666 号南京农业大学行政楼 A320《畜牧与兽医》编辑部

邮 编：211800

电 话：025-84395701 (编辑部)

E-mail：myyizz@njau.edu.cn