

闫彩虹,周家宪,王志强.猪粪便中伊维菌素排泄及降解规律的研究[J].江苏农业科学,2016,44(5):305-307.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.05.088

# 猪粪便中伊维菌素排泄及降解规律的研究

闫彩虹<sup>1</sup>,周家宪<sup>2</sup>,王志强<sup>1</sup>

(1.扬州大学兽医学院,江苏扬州 225009; 2.正大天晴药业集团股份有限公司,上海 200000)

**摘要:**通过建立检测猪粪便中伊维菌素含量的 HPLC 方法,研究伊维菌素在猪粪便中的排泄规律,并在实验室条件下研究光照、温度和微生物因素对猪粪中伊维菌素降解的影响。结果表明,健康育肥猪分别混饲给予 30、100、200 mg/kg 的伊维菌素后,可在混饲给药后 1 d 的猪粪便中检测到伊维菌素,猪粪中伊维菌素排泄量在采食后 3.5 d 达到最高峰,峰浓度分别为 13.58、30.11、52.16 mg/kg,并于 144、168、168 h 时检测不到伊维菌素。在伊维菌素初始浓度分别为 20、40、80 mg/kg 的猪粪中,避光条件下,其平均半衰期为 126.64 d,而光照条件下的平均半衰期仅为 55.16 d。相同伊维菌素浓度的猪粪在 15、25、35 ℃ 时的半衰期随温度升高有缩短趋势,而 50 ℃ 时半衰期较 15 ℃ 时延长。在未灭菌、灭菌及灭菌后添加伊维菌素高效降解菌的情况下,3 组的平均半衰期分别为 62.9、113.2、33.1 d。由此可见,应重视伊维菌素原形进入环境后的生态毒理学效应,必要时适当延长其休药期,另外还可以通过加强光照、堆肥和添加一定浓度的高效降解菌来加速猪粪中伊维菌素的降解,减少环境中药物的残留。

**关键词:**猪粪;伊维菌素;排泄;降解

**中图分类号:** S828.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)05-0305-03

伊维菌素是一种广谱、高效、安全和用量小的大环内酯类抗寄生虫药,其应用非常广泛。2003 年伊维菌素被注册用于治疗人圆线虫病,在日本伊维菌素被用于控制老人的疥疮并发症<sup>[1]</sup>。养猪场通过饲喂含伊维菌素的饲料或使用伊维菌素注射液抗猪体内外寄生虫。药物大部分以原形形式随畜禽粪便排出体外,这些含有伊维菌素的粪便直接或以施肥方式进入土壤或水体,导致环境中伊维菌素残留及其耐药菌株的增加。因此,猪场对猪粪的处理方式直接影响药物的环境残留及生态效应。国内外许多文献相继报道阿维菌素类药物在一些动物及水产品体内残留消除规律的研究工作,如阿维菌素在绵羊粪<sup>[2]</sup>,多拉菌素在犬<sup>[3]</sup>、猪粪<sup>[4]</sup>、绵羊粪<sup>[2]</sup>中残留消除规律,但到目前为止,伊维菌素在猪粪中的残留消除规律的研究未见报道。

本试验在建立猪粪中伊维菌素 HPLC 检测方法的基础上,研究商品肉猪饲喂含不同剂量伊维菌素的饲料后猪粪中伊维菌素浓度的变化规律,为伊维菌素药代动力学和生态毒理学方面的研究提供参考。另外,在外界环境中,光照、温度和微生物等因素都会影响化学物质稳定性及环境残留,因此本试验拟在实验室条件下研究光照、温度和微生物因素对猪粪中伊维菌素降解规律的影响,为研究畜禽排泄物作为肥料的安全性及可能对生态环境的影响提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

收稿日期:2015-04-01

资助项目:江苏高校优势学科建设工程资助项目(编号:PA PD)。

作者简介:闫彩虹(1986—),女,江苏扬州人,硕士研究生,研究方向为兽医药理与毒理学。E-mail:403541924@qq.com。

通信作者:王志强,教授,研究方向为兽医药理与毒理学。E-mail:zqwang@yzu.edu.cn。

1.1.1 试验动物 35 日龄体质量、健康状况相近的商品猪 40 头,购自扬州市邗江区富得养猪场,平均体质量(30±1)kg。试验前预饲 1 周,预饲料中不添加任何兽药。

1.1.2 猪粪 采集健康猪的新鲜粪样,经检测不含伊维菌素,用于猪粪中伊维菌素降解规律研究。

1.1.3 试剂与仪器 伊维菌素原料药,含量 97.3%,浙江升华拜克生物股份有限公司产品。乙腈、甲醇均为色谱纯,其他化学试剂均为国产分析纯。高效液相色谱仪(配 LC-10ATVP 泵、SPD-10ATVP 紫外检测器),日本岛津公司产品;ODS-2HYPERASIL(250 mm×4.6 mm,5 μm)不锈钢色谱柱,菲罗门科技产品;Agilent SPE 固相萃取小柱(500 mg/3 mL),美国 Agilent 公司产品。

### 1.2 猪粪中伊维菌素浓度的测定

样品前处理:取 1.0 g 猪粪,加入 10 mL 乙腈,涡旋混合 2 min,超声萃取 10 min,5 000 r/min 离心 10 min,取上清于另一干净离心管中,沉淀再加入 5 mL 乙腈,按上述方法重复提取 1 次。混合 2 次的上清液,在上清液中加入 15 mL 乙腈饱和的正己烷溶液,混匀后 4 ℃ 静置 20 min,弃去分层后的上层正己烷液,取下层液体过固相萃取小柱。固相萃取小柱先用 1 mL 甲醇激活,1 mL 水平衡,然后再将下层液体过柱。加 30% 甲醇水溶液清洗小柱,再用 93% 甲醇水溶液洗脱。洗脱液 13 000 r/min 4 ℃ 离心 10 min,取上清液过滤后待测。

色谱条件:流动相甲醇:水=93:7(体积比),流速 1 mL/min,检测波长 245 nm,柱温 30 ℃,进样量 20 μL。

### 1.3 试验方法

1.3.1 伊维菌素在猪粪便中的排泄规律 将 40 头猪随机分为 4 组,每组 10 头。各组给药情况如下:第 1 组空白组,即不添加任何兽药,第 2~4 组分别以含 30、100、200 mg/kg 伊维菌素的全价饲料饲喂 1 次。各组猪给药之前采集空白新鲜粪便 1 次,并在给药后 12、24、36、48、60、72、84、96、120、144、

168、192 h 分别收集新鲜粪样,按上述方法处理后检测。

1.3.2 光照对猪粪便中伊维菌素降解的影响 取 9 cm 玻璃平皿若干,各称取 20 g 经通气灭菌的空白猪粪于平皿中,分别加入系列浓度的伊维菌素标准液后混匀,使伊维菌素浓度分别为 20、40、80 mg/kg。制得的样品分 2 批,第 1 批分 3 组,25 ℃ 避光放置;第 2 批 3 组样品于光照培养箱中 25 ℃,光照度 6 500 lx,光暗比 12 h∶12 h 放置。取样时间为 0、1、2、4、7、10、15、20、25、30、35、40、45、50 d。

1.3.3 温度对猪粪便中伊维菌素降解的影响 非灭菌的空白猪粪中分别添加伊维菌素标准工作液,使伊维菌素浓度分别为 20、40、80 mg/kg,然后置于恒温 15、25、35、50 ℃ 避光条件下培养。取样时间同“1.3.2”节。

1.3.4 微生物对猪粪便中伊维菌素降解的影响 试验分 A、B、C 3 组,每个平皿称取 20 g 空白猪粪,A 组不进行灭菌处理,B、C 2 组进行高温通气灭菌处理,A、B、C 3 组分别加入系列浓度伊维菌素标准液混匀,使每组样品中伊维菌素浓度分别为 20、40、80 mg/kg,C 组各平皿加入一定浓度伊维菌素高效降解菌混匀,而 A、B 2 组则加入与菌液等量的无菌超纯水,最终制得未灭菌组、灭菌组和灭菌后加降解菌组 3 组样品。所有样品 25 ℃ 避光培养。取样时间同“1.3.2”节。

所添加的高效降解菌来自于笔者所在实验室筛选出的对伊维菌素具有高效降解性的细菌,经鉴定为枯草芽孢杆菌。

2 结果与分析

2.1 伊维菌素在猪粪便中的排泄规律

将 HPLC 分析所得的伊维菌素色谱峰面积代入标准曲线回归方程,计算出试验组猪饲喂含伊维菌素的饲料后不同时间点猪粪中伊维菌素的浓度值(表 1),对照组均未检测出药物。100 mg/kg 和 200 mg/kg 试验组猪在采食含伊维菌素的饲料后 12 h,即能从猪粪便中检测出伊维菌素;30 mg/kg 组在采食后 24 h 可检测出伊维菌素。84 h 后 3 个添加剂量组均出现峰浓度,分别为 13.58、30.11、52.16 mg/kg,并分别在 144、168、168 h 时各组猪粪中均检测不到伊维菌素。

表 1 各试验组猪粪中伊维菌素浓度(n=10) mg/kg				
时间(h)	空白对照组	30 mg/kg 组	100 mg/kg 组	200 mg/kg 组
0	ND	ND	ND	ND
12	ND	ND	1.26±0.64	2.30±0.72
24	ND	2.52±1.14	3.76±0.85	6.82±1.27
36	ND	2.95±1.43	5.21±1.12	14.21±2.52
48	ND	3.77±2.18	7.98±1.35	25.88±3.29
60	ND	5.16±3.09	12.46±2.42	30.73±4.58
72	ND	7.51±3.20	18.57±2.69	38.49±4.26
84	ND	13.58±3.56	30.11±3.87	52.16±4.88
96	ND	6.22±2.51	20.55±3.36	41.33±4.60
108	ND	4.01±2.06	15.43±2.58	25.09±3.11
120	ND	2.41±1.21	7.11±1.69	11.12±2.34
144	ND	ND	3.84±1.27	5.48±0.96
168	ND	ND	ND	ND

注:ND 为未检出。

2.2 光照对猪粪便中伊维菌素降解的影响

25 ℃ 恒温培养 50 d,光照组和避光组猪粪中伊维菌素的

浓度出现差异,将猪粪中伊维菌素浓度随时间变化的趋势进行曲线拟合,发现各样品的变化趋势均符合  $C = C_0e^{-kt}$  的动力学方程,其中  $t_{1/2} = \ln(2/k)$ 。由表 2 可知,无论在光照还是避光条件下,高浓度组的半衰期均高于低浓度组的半衰期,说明药物浓度越高,降解越慢。另外在不同光照条件下,光照组猪粪中伊维菌素的平均半衰期为 55.16 d,而避光组猪粪中伊维菌素的平均半衰期为 126.64 d,说明光照因素对猪粪中伊维菌素的降解起着非常重要的作用。

表 2 不同光照条件下伊维菌素在猪粪中的降解动力学参数				
处理	初始浓度(mg/kg)	回归方程	相关系数(r)	半衰期(d)
避光	20	$C = 19.062e^{-0.0076t}$	0.980 3	91.32
	40	$C = 38.749e^{-0.0052t}$	0.958 9	133.37
	80	$C = 78.635e^{-0.0042t}$	0.961 2	165.24
	平均			126.64
光照	20	$C = 18.692e^{-0.0198t}$	0.974 8	36.19
	40	$C = 39.124e^{-0.0124t}$	0.986 6	56.68
	80	$C = 78.928e^{-0.0098t}$	0.986 3	72.62
	平均			55.16

2.3 温度对猪粪便中伊维菌素降解的影响

各浓度样品不同温度条件下培养 50 d,猪粪中伊维菌素的浓度随时间的变化趋势均符合动力学方程  $C = C_0e^{-kt}$ ,  $t_{1/2} = \ln(2/k)$ (表 3)。15、25、35 ℃ 条件下相同浓度样品伊维菌素的半衰期随温度升高相应缩短,但 50 ℃ 时半衰期较 15 ℃ 时延长。说明温度过高会抑制伊维菌素在猪粪中的降解,即在一定范围内环境温度的升高可以促进猪粪中伊维菌素的降解。

表 3 不同温度条件下伊维菌素在猪粪中的降解动力学参数				
温度(℃)	初始浓度(mg/kg)	回归方程	相关系数(r)	半衰期(d)
15	20	$C = 19.165e^{-0.0119t}$	0.980 6	58.46
	40	$C = 39.148e^{-0.0091t}$	0.976 9	76.07
	80	$C = 78.821e^{-0.0069t}$	0.951 8	89.21
	平均			74.58
25	20	$C = 18.760e^{-0.0140t}$	0.984 0	49.47
	40	$C = 38.842e^{-0.0116t}$	0.981 6	59.87
	80	$C = 78.255e^{-0.0096t}$	0.978 3	72.58
	平均			60.64
35	20	$C = 18.592e^{-0.0157t}$	0.952 8	44.15
	40	$C = 38.871e^{-0.0132t}$	0.971 3	52.31
	80	$C = 78.149e^{-0.0110t}$	0.977 2	62.87
	平均			53.11
50	20	$C = 19.313e^{-0.0091t}$	0.983 5	71.23
	40	$C = 39.221e^{-0.0080t}$	0.972 8	86.69
	80	$C = 78.824e^{-0.0069t}$	0.981 5	100.36
	平均			86.09

2.4 微生物对猪粪便中伊维菌素降解的影响

微生物条件不同(未灭菌、灭菌、灭菌后添加降解菌)的 3 组样品 25 ℃ 避光培养 50 d,猪粪中伊维菌素的浓度随时间的变化趋势均符合动力学方程  $C = C_0e^{-kt}$ ,  $t_{1/2} = \ln(2/k)$ 。由表 4 可知,未灭菌组、灭菌组和灭菌后加降解菌组的平均半衰期分别为 62.9、113.2、33.1 d。说明微生物活性对药物的降解影响很大,猪粪中本身存在的微生物有助于伊维菌素的降解,

表 4 不同微生物条件下伊维菌素在猪粪中的降解动力学参数

处理	初始浓度 (mg/kg)	回归方程	相关系数 ( <i>r</i> )	半衰期 ( <i>d</i> )
灭菌	20	$C = 10.04e^{-0.0088t}$	0.959 1	78.7
	40	$C = 18.293e^{-0.0067t}$	0.968 8	103.4
	80	$C = 38.718e^{-0.0044t}$	0.947 9	157.5
	平均			113.2
未灭菌	20	$C = 9.936e^{-0.0171t}$	0.961 1	40.5
	40	$C = 18.757e^{-0.0137t}$	0.983 7	50.6
	80	$C = 39.123e^{-0.0071t}$	0.985 4	97.6
	平均			62.9
灭菌加降解菌	20	$C = 10.252e^{-0.0478t}$	0.967 4	14.5
	40	$C = 17.246e^{-0.0206t}$	0.979 7	33.6
	80	$C = 38.3954e^{-0.0135t}$	0.969 9	51.3
	平均			33.1

同时在灭菌猪粪中添加伊维菌素降解菌亦可促进伊维菌素的降解。

3 讨论与结论

3.1 伊维菌素在猪粪便中的排泄规律

吴中兴等报道伊维菌素在狗、牛、羊、猪及大鼠体内,无论是皮下注射、胃内给药还是口服途径均能很快吸收;药物主要经粪便排泄,仅约 2% 从尿排出<sup>[5]</sup>。从本试验结果可看出,猪采食含伊维菌素的饲料后一定时间内会有相应量的伊维菌素随粪便排出体外,残留于猪粪中的药物浓度随药物添加浓度增加而增加。这说明伊维菌素在猪体内代谢很少,大部分以原形形式通过粪便排出体外。这些含有伊维菌素的粪便直接或以施肥方式进入周围的土壤、地表水和地下水中,必须注意其进入环境后的生物学效应。已有研究表明,猪粪和猪场污水中含有大量兽药原形及其代谢产物的残留。Zhao 等调查了中国 8 个省份的大型饲养场粪便中抗生素残留情况,结果显示在猪粪、牛粪和鸡粪中都有四环素类抗生素残留<sup>[6]</sup>。

本研究结果还表明,30、100、200 mg/kg 试验组猪均在采食 3.5 d 后的猪粪中出现药物峰浓度及在第 7 天时各组才均检测不到伊维菌素。按国家规定,使用伊维菌素驱虫,休药期至少应达到牛 28 d、羊 8 d 和猪 5 d 之后才能屠宰上市。这说明在试验用药剂量条件下,现在规定的猪的休药期(5 d)并不能完全使残留在猪体内的伊维菌素排泄完毕。王小庆等研究了磺胺二甲嘧啶在猪粪中的排泄规律,也发现在停药后 20 d 仍能在猪粪中检测到 SM<sub>2</sub>,说明目前规定的 SM<sub>2</sub> 的休药期(14 d)并不能使残留在猪体内的 SM<sub>2</sub> 排泄完全<sup>[7]</sup>。因此在按要求连续给畜禽饲喂伊维菌素后,应适当延长其休药期,以减少伊维菌素在畜禽体内和排泄物中的残留。同时,由于在用药期内,伊维菌素在猪粪中的残留峰浓度远高于其最小抑菌浓度,因此必须重视用药后猪排出的含伊维菌素的粪便对环境的生态毒理学效应。吴昊等研究伊维菌素对 7 种水生生物的急性毒性试验表明,伊维菌素对斑马鱼、食蚊鱼和鲫鱼鱼苗表现出较高的毒性,对罗氏沼虾和大型溞均属极高毒<sup>[8]</sup>。

3.2 光照、温度和微生物对猪粪便中伊维菌素降解的影响

在规范良好的试验条件、准确的采样分析技术条件下,药

物在环境中的单纯降解一般可以用指数负增长模型  $C = C_0e^{-kt}$  来表达<sup>[9]</sup>。因此,本试验采用指数负增长模型来拟合伊维菌素于不同光照、温度和微生物影响因素下在猪粪中的降解规律。研究结果表明,猪粪中伊维菌素的降解受光照和微生物的影响较明显,一定范围内温度的提高对猪粪中伊维菌素的降解有促进作用。因此,可以通过加强光照、堆肥和添加一定浓度的伊维菌素高效降解菌来加速猪粪中伊维菌素的降解,减少环境中伊维菌素的残留,为有效地处理粪便污染以及降低环境中特定药物残留对策提供了一定的参考。Bednar 等研究表明,光照可以加快鸡粪中洛克沙肿的降解<sup>[10]</sup>。因此,猪粪被清除到猪舍外后,在用作肥料使用前可以进行适当的摊晒,有利于猪粪中伊维菌素的降解。目前,处理畜禽粪便最常用的方式是堆肥法。张树清等报道,高温堆肥对畜禽粪便中四环素类抗生素具有不同程度的降解效果,而且堆肥中添加特定药物降解菌剂可加快粪便中残留药物的去除<sup>[11]</sup>。目前,国内已有“农药残留降解菌剂”产品问世,并获得专利。因此,可以利用微生物来减少环境中的农药残留<sup>[12]</sup>。

由此可见,养猪场应重视对猪粪的处理及伊维菌素进入环境后的生态毒理学效应,必要时适当延长休药期,另外还可以通过加强光照、堆肥和添加一定浓度的伊维菌素降解菌来加速猪粪中伊维菌素的降解,减少环境中药物的残留。

参考文献:

[1] 张毅,胡西洲. 阿维菌素及其衍生物的研究进展[J]. 湖北农业科学,2007,46(5):845-848.

[2] Kolar L, Flajs V C, Kuzner J, et al. Time profile of abamectin and doramectin excretion and degradation in sheep faeces[J]. Environmental Pollution,2006,144(1):197-202.

[3] 张萍. 多拉菌素在犬体内的药动学及其组织残留研究[D]. 南京:南京农业大学,2006.

[4] 刘向明,饶钦雄,刘慧慧,等. 多拉菌素在猪粪便中的残留消除规律研究[J]. 中国兽医杂志,2007,43(2):74-76.

[5] 吴中兴,钱益新. 伊维菌素的药效、药理和临床研究[J]. 热带病与寄生虫学,2003,1(3):184-187.

[6] Zhao L, Dong Y H, Wang H. Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China[J]. The Science of the Total Environment,2010,408(5):1069-1075.

[7] 王小庆,郭瑞鹏,马保华,等. 3 种兽药及其主要代谢产物在猪粪中的排泄规律[J]. 中国兽医学报,2014,34(2):269-274.

[8] 吴昊,江敏,彭章晓,等. 伊维菌素在环境中的降解及其对七种水生生物的急性毒性研究[J]. 水生生物学报,2012,36(5):965-970.

[9] McKellar Q A. Ecotoxicology and residues of anthelmintic compounds[J]. Veterinary Parasitology,1997,72(3/4):413-435.

[10] Bednar A J, Garbarino J R, Ferrer I, et al. Photodegradation of roxarsone in poultry litter leachates[J]. The Science of the Total Environment,2003,302(1/2/3):237-245.

[11] 张树清,张夫道,刘秀梅,等. 高温堆肥对畜禽粪中抗生素降解和重金属钝化的作用[J]. 中国农业科学,2006,39(2):337-343.

[12] 李荣,贾开志,蒋建东,等. 敌敌畏、敌百虫高效降解菌株 DDB-1 的分离鉴定及降解特性研究[J]. 农业环境科学学报,2007,26(2):554-558.