

氟苯尼考在鸡粪中的降解特性

刘伟¹, 匡光伟², 陈小军^{1,3}, 许朝爰⁴, 孙志良^{1*}

(1.湖南农业大学 动物医学院, 湖南 长沙 410128; 2.湖南省兽药饲料监察所, 湖南 长沙 410006; 3.湖南省兽药工程技术中心, 湖南 长沙 410128; 4.湖南五指峰生化有限公司, 湖南 长沙 410325)

摘要: 为探明鸡粪中氟苯尼考的降解特性, 采用气相色谱法, 分别研究微生物、有机质、光照、氟苯尼考起始浓度与鸡粪中氟苯尼考降解的关系, 以 20 °C 恒温培养箱中避光培养的未灭菌、未去有机质的鸡粪中氟苯尼考降解为对照, 结果表明, 对照氟苯尼考的降解半衰期为 1.9 d, 降解动力学方程为 $C_t=7.81 \times e^{-0.369 9t}$, 11 d 的降解率达 95%; 与对照相比, 高温灭菌和去除有机质后, 鸡粪中氟苯尼考的降解能力显著下降, 半衰期分别提高到 6.4、7.2 d; 光照处理与避光处理(对照)鸡粪中氟苯尼考降解的半衰期、降解速率常数和降解速率方程均无明显差异; 氟苯尼考起始含量 5、10 mg/kg 的半衰期差异不大, 分别为 1.8、1.9 d, 而 20 mg/kg 的半衰期延长至 5.6 d.

关键词: 氟苯尼考; 鸡粪; 微生物降解; 半衰期

中图分类号: S859.79⁺6 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)05-0561-04

Degradation of florfenicol in chicken feces

LIU Wei¹, KUANG Guang-wei², CHEN Xiao-jun^{1,3}, XU Zhao-ai⁴, SUN Zhi-liang^{1*}

(1.College of Veterinary, HNAU, Changsha 410128, China; 2.Hunan Provincial Institute of Animal Drug and Feed Supervision, Changsha 410006, China; 3.Hunan Provincial Veterinary Medicine Engineering Technology Research Center, Changsha 410128, China; 4.Hunan Wuzhifeng Biochemistry Co., Ltd., Changsha 410325, China)

Abstract: In order to its degradation characteristics by use of GC, the relationship between micro-organisms, organic matter, light, initial concentration of florfenicol, and florfenicol in chicken feces were investigated, the degradation of florfenicol in non-sterilized chicken feces without organic matter removing was taken as the controlled group by culturing it in incubator with constant temperature at 20 °C under the dark. The result indicated that chicken feces was prevented from light under 20 °C condition, the half-life of florfenicol was 1.9 d, the degradation kinetic equation was $C_t=7.81 \times e^{-0.369 9t}$, the degradation rate reached 90% within 11 d. Compared with the controlled group, the degradation rate of florfenicol in chicken manure decreased markedly under the handling of sterilization and removal of organic matter. The half-lives grew up to 6.4 d and 7.2 d. The differences between the Initial concentration of 5 mg/kg and 10 mg/kg were not remarkable, and the half-life was 1.8 d and 1.9 d respectively, while when the Initial concentration rise to 20 mg/kg, the half-life extend to 5.8 d. Under either the condition of illumination or light prevention, the half-life, degradation kinetic equation and constant of degradation rate constant of florfenicol displayed no differences.

Key words: florfenicol; chicken feces; microbial degradation; half-life

氟苯尼考(Florfenicol, FF)又名氟甲砜霉素, 是 20 世纪 80 年代美国 Sehering-Plough 公司研制的新一代酰胺醇类动物专用半合成抗生素^[1-2], 具有抗菌

谱广、吸收性好、安全高效、体内分布广等特点, 无潜在致再生障碍性贫血作用^[3-4], 对敏感菌所致的动物感染具有显著疗效, 已被广泛应用于家畜、家

收稿日期: 2010-05-17

基金项目: 湖南省科学技术厅重大专项(2009FJ1005)

作者简介: 刘伟(1983—), 男, 湖南郴州人, 硕士研究生, 主要从事兽医药理与毒理学研究; *通讯作者, sunzhi-liang1965@yahoo.com.cn

禽和水产动物养殖^[5-6]。氟苯尼考及其代谢产物在动物机体中残留会危害动物源性食品安全,影响人类健康,随动物粪便排泄到环境中后又危害自然环境。目前,对氟苯尼考的研究主要是关于家畜的临床应用、体内代谢动力学及其动物源性食品药物残留等方面^[7-14]。氟苯尼考进入动物体内经粪便和尿液排出体外后,影响氟苯尼考在环境中降解的因素及其降解速率尚未见报道。笔者研究经不同环境因子处理后鸡粪中氟苯尼考的降解特性,旨在探明氟苯尼考在鸡粪中的最佳降解条件,为畜牧生产中的粪便处理和环境监控提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试动物为6周龄左右健康湘黄鸡20只,公、母各10只,购于湖南省畜牧研究所,为省级标准实验动物。用不含抗菌药物的全价日粮饲养,自由饮水,采食。试验前确定鸡粪中不含氟苯尼考。

1.2 仪器与试剂

主要仪器为Agilent 6890N气相色谱仪。

主要试剂为氟苯尼考标准品(批号K0300801,纯度99.5%,中国兽药饲料监察所)、衍生化试剂(三氟乙酰胺(BSTFA)+三甲基氯硅烷(TMCS)(99+1),Suwelco)、乙腈、甲醇(色谱纯, TEDIA Company)、乙酸乙酯(分析纯,南京化学试剂有限公司)、氯化钠(分析纯,焦作鑫安科技股份有限公司)、正己烷(优级纯,广州化学试剂厂)、 N_2 (99.999%,长沙鑫湘气体化工有限责任公司)。

1.3 试验设计

采集新鲜鸡粪,准确称取2.0 g,装入40 mL具塞离心管中, -80℃冷冻保存。临用前室温下解冻。设4个处理组和1个对照组(表1),分别考查微生物、有机质、光照、氟苯尼考起始浓度对鸡粪中氟苯尼考降解的影响。4个处理组均加入氟苯尼考标准储备液,使鸡粪中的氟苯尼考含量均为10 mg/kg。每组设3个重复,分别于加入氟苯尼考标准液后0、2、4、12、24、72、120、168、264 h取样,分析测定鸡粪中氟苯尼考残留量。

表1 各处理的操作方法

Table 1 Operation method of each treatment

处理	操作方法
灭菌组	将具塞离心管放入手提式压力蒸汽消毒器,于103 kPa、121.3℃下灭菌30 min后,置于20℃恒温培养箱中避光培养。每次取样都在无菌室操作
去有机质组	用 H_2O_2 去除鸡粪中的有机质后,将具塞离心管放入20℃恒温培养箱中避光培养
光照组	将具塞离心管置于平均温度25.3℃的室外自然光下
不同起始浓度组	设5、10、20 mg/kg不同起始含量
对照组	将未灭菌、未去有机质的鸡粪置于20℃恒温培养箱中避光培养

1.4 鸡粪中氟苯尼考残留量的测定

1.4.1 色谱条件选择

色谱柱为毛细管柱;ECD检测器;载气为氮气;线速度28 mL/min;进样方式为不分流;进样体积1 μ L;检测器温度300℃,进样口温度250℃;进样时间1 min;柱温:150℃保持1.0 min,程序升温模式,升温速率25℃/min,270℃保持10 min。

1.4.2 鸡粪中氟苯尼考残留量的测定

鸡粪中氟苯尼考残留量的测定参照文献[15]。样品的提取与纯化方法为:

(1) 提取。具塞离心管中加入10 mL乙酸乙酯,涡旋至混匀,4 000 r/min离心10 min,将上清液移至25 mL鸡心瓶,重复操作1次,将2次上清液合并,40℃旋转蒸发至干,用1 mL甲醇溶解,涡旋混匀,加入10 mL 4% NaCl溶液,转移至25 mL具塞离心管中,加入10 mL正己烷,涡旋混匀,4 000 r/min离心10 min,弃去上层液,重复操作1次。

(2) 纯化。先后用5 mL甲醇和10 mL超纯水活化固相萃取柱上样,提取液上样,5 mL超纯水淋洗,最后用3 mL乙腈进行洗脱,收集洗脱液。

(3) 衍生化。50℃水浴氮气吹干洗脱液,加入100 μ L衍生化试剂,涡旋混匀,65℃恒温反应30 min,待冷却至室温后氮气吹干衍生化试剂,加入1 mL正己烷,涡旋1 min,气相色谱法检测。

2 结果与分析

将鸡粪中氟苯尼考残留量(C_t)与降解时间(t)进行指数相关回归分析,得到回归方程的相关系数

为 0.885 1~0.969 5, 氟苯尼考在鸡粪中的降解规律可以用一级动力学方程来描述: $C_t = C_0 \times e^{-kt}$, 式中, C_0 为氟苯尼考初始浓度; k 为降解速率常数. 氟苯尼考的降解半衰期 $T_{1/2} = \ln 2/k$.

2.1 微生物、光照和有机质对鸡粪中氟苯尼考降解的影响

由表 2 可见, 对照组氟苯尼考的降解半衰期为 1.9 d, 经灭菌处理后, 鸡粪中氟苯尼考的降解率明显低于对照, 降解半衰期上升至 6.4 d, 后者是前者的 3.36 倍. 11 d 时, 对照组氟苯尼考的残留浓度已下降至原浓度的 5%, 降解率为 95.0%, 而灭菌组的降解率只有 53.8%(图 1). 灭菌组试验结果反映的是非生物降解作用, 对照组试验结果反映的是微生物和非生物降解的共同作用, 结果表明氟苯尼考在鸡粪中降解时微生物起主导作用.

表 2 各处理的降解动力学参数
Table 2 Degradation kinetic parameters of different treatments

处理	降解动力学方程	相关系数	半衰期 /d	降解速率常数/d ⁻¹
对照组	$C_t = 7.81 \times e^{-0.369 9t}$	0.965 5	1.9	0.369 9
灭菌组	$C_t = 9.45 \times e^{-0.108 3t}$	0.885 1	6.4	0.108 3
光照组	$C_t = 7.69 \times e^{-0.385 8t}$	0.969 5	1.8	0.385 8
去除有机质组	$C_t = 9.69 \times e^{-0.075 0t}$	0.941 9	9.2	0.075 0

与对照相比, 去除有机质后, 鸡粪中氟苯尼考的降解能力明显下降, 其降解半衰期为 9.2 d(表 2), 是对照组半衰期的 4.84 倍. 该组氟苯尼考残留浓度一直维持在较高水平, 11 d 时氟苯尼考的降解率为 44.6%(图 1). 有机质含量越高, 鸡粪中氟苯尼考降解越快, 这可能与有机质含量越高, 鸡粪中微生物

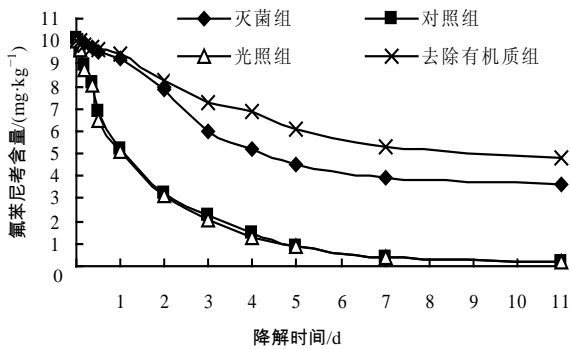


图 1 各处理氟苯尼考不同降解时间的残留量
Fig.1 Residue concentration of florfenicol at different time of degradation

数量越多有一定关系.

光照条件下, 鸡粪中氟苯尼考的降解半衰期为 1.8 d, 虽然光照对鸡粪中氟苯尼考的降解有一定的影响, 但是与微生物降解相比, 影响很小. 鸡粪中氟苯尼考残留量与降解时间的关系, 光照组与避光组(对照)的差异不明显, 其一级动力学方程曲线基本重合.

2.2 不同起始浓度对鸡粪中氟苯尼考降解的影响

由表 3 可见, 氟苯尼考起始含量 5、10、20 mg/kg 的降解半衰期分别为 1.8、1.9、5.6 d. 高浓度(20 mg/kg)组的降解半衰期是对照组的 2.94 倍, 但是低浓度(5 mg/kg)组的降解半衰期与对照组无明显差别, 这可能与在一定范围内药物和微生物的相互作用有关.

表 3 不同起始浓度鸡粪中氟苯尼考降解的动力学参数
Table 3 Degradation kinetic parameters of florfenicol with different initial concentrations in hen dung

FF起始含量 / (mg·kg ⁻¹)	降解动力学方程	相关系数	半衰期/d	降解速率常数/d ⁻¹
5	$C_t = 3.56 \times e^{-0.390 5t}$	0.904 9	1.8	0.390 5
10	$C_t = 7.81 \times e^{-0.369 9t}$	0.965 5	1.9	0.369 9
20	$C_t = 16.8 \times e^{-0.123 6t}$	0.918 3	5.6	0.123 6

不同起始浓度氟苯尼考的降解趋势不同(图 2), 随氟苯尼考浓度由低到高, 降解速率由快到慢, 11 d 的降解率依次为 96.2%、95.0% 和 61.3%. 由于氟苯尼考是一种抗微生物药物, 对微生物有一定的活性, 当其浓度较低时, 鸡粪中微生物比较活跃, 药物被迅速降解; 随着药物浓度的增加, 微生物的活性会越来越低, 导致微生物对药物的降解被削弱.

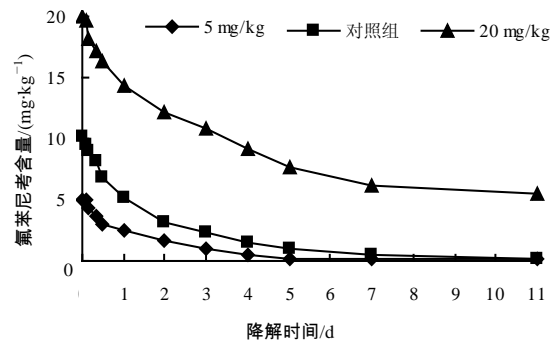


图 2 不同起始浓度氟苯尼考不同降解时间的残留量
Fig.2 Residue concentration of differently-concentrated florfenicol at different time of degradation

3 结论与讨论

高温灭菌和去除有机质后,鸡粪氟苯尼考的降解能力显著下降,半衰期增加;光照处理与避光处理,鸡粪中氟苯尼考降解的半衰期、降解速率常数和降解速率方程均无明显差异;氟苯尼考起始含量5、10 mg/kg的半衰期差异小,分别为1.8、1.9 d,而20 mg/kg的半衰期延长至5.6 d.氟苯尼考在鸡粪中的吸附和转化作用并不强,降解方式主要是微生物降解.开始阶段粪便中营养物质丰富,随着培养时间的延长,微生物数量增长较快,氟苯尼考残留量快速减少;当粪便中的营养物质耗尽时,微生物数量减少,氟苯尼考降解速率随之减缓.

a. 在20℃避光条件下,灭菌处理明显减缓了鸡粪中氟苯尼考的降解.在灭菌条件下,鸡粪中的微生物被杀死,降解途径主要是非微生物降解,如化学降解、水解、电解等.这说明鸡粪中自然微生物条件对氟苯尼考的降解起重要作用.

b. 去除有机质鸡粪中,氟苯尼考的降解速率显著减缓.普通鸡粪中氟苯尼考降解11 d的残留量下降到初始时的10%以下,而去除有机质后较长时间仍会有氟苯尼考残留,降解率非常低.有机质提高了氟苯尼考的降解速率,这可能是因为有有机质为微生物的生长提供了营养物质,维持了粪肥的生物多样性和多态性.

c. 低浓度状态下,鸡粪中的氟苯尼考降解不受浓度影响,高浓度则抑制了细菌生长繁殖,阻碍微生物降解;阻碍有机氮氨化和 $\text{NH}_4\text{-N}$ 循环,抑制生物硝化反应,进一步阻碍其他降解作用^[16].宗虎民等^[17]发现,氟苯尼考对海洋沉积物中的生物酶活性具有抑制作用,高浓度的氟苯尼考能抑制碱性磷酸酶和亚硝酸还原酶,且呈剂量依赖性和时间依赖性,随着作用剂量和时间增加,抑制作用越明显.

d. 光照对降解半衰期和降解速率的影响甚微.相对于微生物降解,光照对氟苯尼考几乎无作用.这可能与氟苯尼考本身性质有关.氟苯尼考对光照不敏感,在光照条件下比较稳定.

参考文献:

[1] Syriopoulou V P, Harding A L, Goldmann D A, et al. *In vitro* antibacterial activity of florfenicol analogs of chloramphenicol and thiamphenicol[J]. *Antimicrobial*

- Agents and Chemotherapy*, 1981, 19(2): 294-297.
- [2] 沈建忠.兽医药理学[M].北京:中国农业出版社,2002: 218-220.
- [3] 萧志梅.氟苯尼考的临床应用及市场状况[J].中国兽药杂志,2000(5): 53-54.
- [4] 张建民,钟超平.兽用广谱抗生素氟苯尼考的合成(一)[J].国外医药抗生素分册,1999,20(1): 65-68.
- [5] 陈杖榴,邱银生.国内外兽药研制开发与市场动态[J].中国兽药杂志,2002,36(3): 42-46.
- [6] Fitzpatrick S C, Amost V, Gerard L, et al. Dietary intake estimates as a means to the harmonization of maximum residue levels for veterinary drugs proposed application to the free trade agreement between the United States and Canada[J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 1996, 24: 177-183.
- [7] Saskia Priebe, Stefan Schwarz. *In vitro* activities of florfenicol against bovine and porcine respiratory tract pathogens[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, 47(8): 2703-2705.
- [8] 廖雅桦,周冀衡,穆小丽,等.凝胶渗透色谱-高效液相色谱-串联质谱法测定烟草中50种农药残留量[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2010,36(4): 404-409.
- [9] Shin S J, Kang S G, Nabin R. Evaluation of the antimicrobial activity of florfenicol against bacteria isolated from bovine and porcine respiratory disease[J]. *Veterinary Microbiology*, 2005, 106(1/2): 73-80.
- [10] 蒋红霞,冯淇辉,曾振灵,等.氟甲砜霉素(Florfenicol)在猪体内的药物动力学[J].中国兽医学报,2001,21(1): 86-89.
- [11] Ho S P, Hsu T Y, Chen M H, et al. Antibacterial effect of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol against aquatic animal bacteria[J]. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2000, 62(5): 479-485.
- [12] 胡顶飞,沈建忠,吴先爱.氟苯尼考静注及肌注在鸡体内药代动力学研究[J].畜牧兽医学报,2002,33(4): 384-388.
- [13] Fukui H, Fujihara Y, Kano T. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of florfenicol, a new fluorinated analog of thiamphenicol, against fish pathogens[J]. *Fish Pathology*, 1987, 22: 201-207.
- [14] 袁宗辉.兽药与人体健康的若干问题[J].中国临床药理学与治疗学,2002,7(3): 276-278.
- [15] GB/22338—2008 动物源性食品中氟喹酮类药物残留量测定方法[S].
- [16] 宗虎民,户江涛,王菊英.氟苯尼考对海洋沉积物中氮循环的影响[J].大连海事大学学报,2007,33(3): 78-82.
- [17] 宗虎民,马德毅,王菊英.氟苯尼考对海洋沉积物酶活性的影响[J].海洋环境科学,2008,27(2): 128-131.

责任编辑:王赛群

英文编辑:罗文翠