

KHẢO SÁT SỰ BÀI THẢI CHLORAMPHENICOL TRÊN TÔM SÚ (*Penaeus monodon*) ĐƯỢC NUÔI TRONG ĐIỀU KIỆN THÍ NGHIỆM BẰNG KỸ THUẬT LC/MS/MS

EVALUATION OF ELIMINATION OF CHLORAMPHENICOL IN SHRIMP (*Penaeus monodon*) UNDER EXPERIMENTAL CONDITIONS USING LC/MS/MS

Nguyễn Thanh Điền, Phùng Võ Cẩm Hồng

Viện NC Công Nghệ Sinh Học và Môi Trường

Trường Đại Học Nông Lâm TpHCM

SUMMARY

The use of Chloramphenicol in shrimp product has been banned in the European Union (EU), the United States and even in Viet Nam. However, to control CAP absence in local farming still remain an open issue. Thus, research on elimination of CAP residues in shrimp muscle (*Penaeus monodon*) were conducted to help manager and farmer use antibiotics efficiently. Muscle residue depletion of CAP following oral administration was evaluated in shrimp under experimental conditions. Four groups of shrimps were cultured in pond and fed a commercial medicated diet containing 2000 mg/kg. Sampling was conducted at different intervals (1, 5, 10, 20, 30, 60, 120 h) after the cessation of medication. Drug analysis was carried out by LC/MS/MS, and LOQ of method was 0,03 ng/g. The concentration of CAP after 60-h post-dosing are undetectable (<0,3 ng/g). So, it is not used in muscle residue depletion of CAP analysis. The elimination half-life ($t_{1/2}$) of CAP was 13,5 h.

MỞ ĐẦU

Chloramphenicol (CAP) là một trong những hóa chất và kháng sinh được liệt vào danh sách cấm sử dụng trong nuôi trồng, chế biến và bảo quản các sản phẩm tôm (theo quyết định của Châu Âu số 2001/699/EC ngày 19/09/2001 cũng như chỉ thị 07/2001/CT-BTS ngày 24/09/2001 của Bộ thủy sản Việt Nam) do các tác hại mãn tính của nó đối với sức khỏe của con người. Tuy nhiên, cũng cần phải thấy rằng ở Việt Nam quy định này chỉ khắt khe cho sản phẩm thủy sản xuất khẩu. Đối với hàng tiêu thụ nội địa thì việc kiểm tra quy trình nuôi, chế biến và bảo quản vẫn còn bỏ ngỏ. Thêm vào đó, các dẫn xuất khác thuộc nhóm phenicols như thiamphenicol và florphenicol có tính độc hại không kém CAP chỉ bị hạn chế sử dụng trong nuôi trồng thủy sản (theo quyết định 2002/657, 2377/90, 508/1999, 1181/2002 của cộng đồng chung Châu Âu về việc cho phép dư lượng tối đa của kháng sinh thiamphenicol trong thực phẩm và các sản phẩm thủy sản là 50ppb; florfenicol là 500ppb).

Vì vậy, việc khảo sát và phân tích sự bài thải CAP sẽ tạo tiền đề cho việc nghiên cứu sự bài thải thiamphenicol và florphenicol sau này. Các kết quả nghiên cứu sẽ giúp cho các nhà quản lý và người chăn nuôi kiểm soát và sử dụng kháng sinh hợp lý nhằm hạn chế tối đa ảnh hưởng nguy hại đến sức khỏe của người tiêu dùng.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguồn tôm

Mẫu tôm sú (*Penaeus monodon*) 50 ngày tuổi sạch bệnh và không nhiễm kháng sinh

tại một trại tôm ở huyện Nhơn Trạch, tỉnh Đồng Nai. Trọng lượng tôm được sử dụng trong thí nghiệm trung bình $6 \pm 0,5$ g/con.

Chuẩn bị ao nuôi

Thí nghiệm được thực hiện trong 4 ao, mỗi ao thả nuôi 50 con tôm. Ao có kích thước 2m x 1m x 0,7m, đáy ao được phủ một lớp bạt và một lớp cát dày 0,5 cm. Nguồn nước được sử dụng có độ mặn 1,5 ‰ và pH = 7,6, mực nước cho vào có độ sâu 0,6m (tương đương 1,2 m³ nước).

Cách cho ăn

Tôm được cho ăn 3 lần trong ngày vào lúc 6 giờ, 11 giờ 30 và 18 giờ. Trong 3 ngày đầu, cả bốn ao đều được cho ăn thức ăn công nghiệp của cơ sở Hải Long (loại dùng cho tôm từ 3-8 cm). Ngày thứ 4 không cho ăn. Ngày thứ 5 và thứ 6 cho tôm ăn thức ăn có chứa kháng sinh CAP với các nồng độ 2000 mg/kg ở hai ao thí nghiệm. Hai ao đối chứng cho tôm ăn thức ăn không có chứa kháng sinh CAP.

Thu mẫu

Thu mẫu lúc 1 giờ, 5 giờ, 10 giờ, 20 giờ, 30 giờ, 60 giờ, 120 giờ tính từ khi ngừng cho ăn hoàn toàn ở cả 4 ao. Ở mỗi thời điểm thu mẫu, tiến hành thu 5 mẫu tôm ngẫu nhiên ở ao đối chứng và ao cho ăn thức ăn trộn kháng sinh với nồng độ 2000 mg/kg. Mẫu sau khi thu được bảo quản ở - 20°C cho đến khi tiến hành phân tích.

Hóa chất và thiết bị

Chất chuẩn Chloramphenicol VETRANAL (99,9%, Sigma-Aldrich); Ethyl acetate, hexan, Sodium Sulphate Anhydrous tinh khiết phân tích (Merck); Methanol, Acetonitrile, Nước cất 2 lần dùng trong LCMS (Baker).

Hệ thống máy LC/MS/MS gồm thiết bị sắc ký lỏng (Dionex Ultimate 3000) kết nối với đầu dò khối phổ ba tứ cực (Bioapplied System Qtrap 4000); bộ bơm mẫu tự động; cột sắc ký pha đảo Phenomenex Aqua 5u C18 125A, 50x2mm và cột bảo vệ pha đảo Phenomenex.

Phương pháp phân tích

CAP được chiết tách từ mẫu thịt tôm bằng ethylacetate, làm khô dịch chiết bằng dòng khí N₂ ở 50°C $\pm$ 5°C. Cặn khô được hòa tan trong acetonitrile và được loại béo bằng n-hexane sau đó định mức bằng pha động H₂O/MeOH (90/10) và được định lượng trên hệ thống LC/MS/MS (Barbara K. Neuhaus và cộng sự, 2002).

Điều kiện phân tích

Điều kiện HPLC: cột sắc ký Phenomenex Aqua 5u C18 125A, 50x2 mm; tốc độ dòng: 0,35-0,4 ml/phút; pha động: A (H₂O) : B (MeOH) theo chương trình gradient ; nhiệt độ cột: 25°C; thể tích bơm mẫu: 20 µl.

Điều kiện đầu dò MS/MS: nguồn tạo ion Turbo Spray, kiểu tạo ion âm, kiểu scan: MRM; điện thế ion hóa: 4200V, nhiệt độ ống mao quản: 500°C.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả quá trình nuôi tôm thí nghiệm

Sau khi tiến hành nuôi và thu mẫu như trình bày ở phần trên, chúng tôi thu được nguồn mẫu tôm dùng cho phân tích sự bài thải CAP.

Bảng 1. Trọng lượng tôm ở các thời điểm thu mẫu

2000 mg CAP trộn trong 1 kg thức ăn						Đối chứng				
	Tôm I(g)	Tôm II(g)	Tôm III(g)	Tôm IV(g)	Tôm V(g)	Tôm I(g)	Tôm II(g)	Tôm III(g)	Tôm IV(g)	Tôm V(g)
1 giờ	5,69	5,93	5,46	6,36	4,39	4,69	5,00	4,07	3,49	6,86
5 giờ	5,73	5,75	5,52	5,35	6,4	6,73	4,84	5,36	4,8	6,12
10 giờ	4,6	7,2	6,75	4,84	5,46	5,21	6,46	4,8	5,01	5,01
20 giờ	5,14	7,39	4,58	5,55	5,39	6,02	8,52	5,14	6,75	4,81
30 giờ	5,92	5,47	6,83	5,52	5,47	4,92	4,58	4,18	5,93	6,75
60 giờ	5,24	6,46	5,39	6,3	6,54	5,24	6,46	5,68	5,46	6,66
120 giờ	6,66	6,89	5,35	4,55	5,82	7,66	4,47	4,69	6,36	4,24

Bảng 1 cho thấy, trọng lượng tôm nuôi trung bình đạt từ 4 - 7 g. Tôm nuôi thí nghiệm có trọng lượng thấp hơn so với tiêu chuẩn Việt Nam về nuôi tôm sú thâm canh (5 - 10 g). Trọng lượng tôm giảm có thể do nguyên nhân nguồn thức ăn không phong phú như ao nuôi công nghiệp và số lần cho ăn cũng không nhiều như nuôi thâm canh. Tuy nhiên, trọng lượng tôm không làm ảnh hưởng nhiều đến phân tích của chúng tôi do tôm sinh trưởng và phát triển bình thường trong môi trường thí nghiệm đồng thời không thấy triệu chứng nhiễm một số bệnh trên tôm như đốm trắng, đầu vàng...

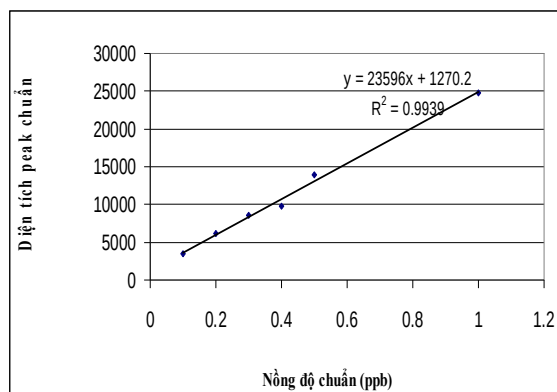
Định lượng CAP dựa trên phân mảnh ion

Theo quyết định 2002/657/EC của Châu Âu, để xác nhận chất phân tích cần có 1 mảnh ion ban đầu và 2 mảnh ion con hội đủ 4 điểm cần thiết (1 mảnh ion ban đầu được cho 1 điểm, 1 mảnh ion con cho 1,5 điểm).

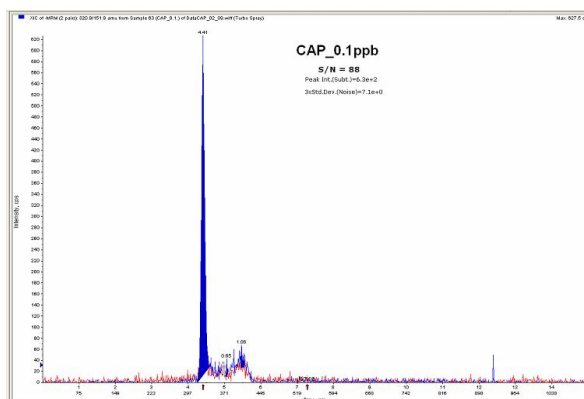
CAP được xác nhận dựa trên phân ion phân tử $m/z=321$; hai ion xác nhận $m/z = 151,9$ và $m/z=256,9$; và chúng được định lượng dựa trên $m/z = 151,9$.

Đường chuẩn định lượng CAP

Đường chuẩn được xây dựng dựa trên 6 điểm chuẩn với các nồng độ chuẩn 0,1 ppb; 0,2 ppb; 0,3 ppb; 0,4 ppb; 0,5 ppb; 1 ppb.



Hình 1. Đường chuẩn CAP (0.1-1ppb)



Hình 2. Phổ đồ ion m/z151.9 ở nồng độ CAP 0.1ppb

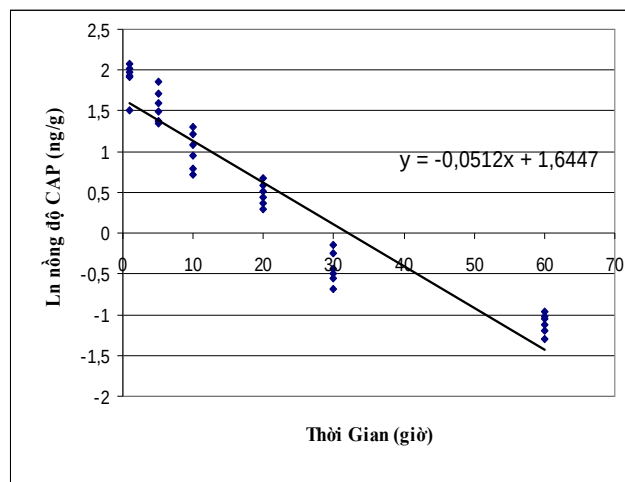
Phương trình đường chuẩn $y = 23596x + 1270,2$; đường chuẩn có hệ số tương quan $R^2 = 0,9939$; giới hạn định lượng của phương pháp là 0,03 ng/g, hiệu suất thu hồi của phương pháp 87, 93% ÷ 116, 80 %.

Xác định sự bài thải CAP trong tôm sú

Các mẫu tôm thu được theo giờ ở ao đối chứng và ao thử nghiệm được ly trích và phân tích sắc ký lỏng ghép khối phổ. Các mẫu tôm đối chứng không phát hiện CAP (<0,03 ng/g). Các mẫu tôm cho ăn thức ăn có trộn CAP cho kết quả được thể hiện ở bảng 2

Bảng 2. Nồng độ CAP trong tôm thu theo giờ

Thời gian sau lần Cho ăn cuối (giờ)	Nồng độ (ppb) trung bình $\pm$ SD (n=6)
1	7,31 $\pm$ 1,12
5	4,44 $\pm$ 2,07
10	2,97 $\pm$ 0,66
20	1,67 $\pm$ 0,34
30	0,60 $\pm$ 0,42
60	0,30 $\pm$ 0,2
120	< 0,3



Nghiên cứu sự tồn lưu và bài thải của các kháng sinh khác thuộc nhóm phenicols hiện đang được sử dụng rộng rãi trên thị trường như thiamphenicol, florphenicol trên tôm nhằm cung cấp những thông tin hữu ích cho người nuôi trồng và quản lý thủy hải sản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Nguyễn Thị Đông, Phạm Văn Tân, Phạm Thị Ánh và Chu Phạm Ngọc Sơn, 2008. Thăm dò tình hình thực phẩm thủy sản bán trên địa bàn TP Hồ Chí Minh bị nhiễm dư lượng kháng sinh Chloramphenicol. *Kỉ yếu ngày hội hóa học TP Hồ Chí Minh lần thứ VI, tiểu ban công nghệ hóa học – phân tích – giảng dạy*.

Bộ Thủy Sản. 2005. *Quyết định số 07/2005/QĐ-BTS ngày 24/2/2005 của Bộ trưởng Bộ Thủy sản về việc ban hành danh mục hoá chất, kháng sinh cấm và hạn chế sử dụng trong sản xuất, kinh doanh thủy sản*.

Neuhaus, B.K., Hurlbut, J.A. and Hammack, W., 2002. *LC/MS/MS Analysis of Chloramphenicol in Shrimp*. FDA/ORR/DFS, No. 4290.

Official journal of the European Union, Commission Decision of 13 March 2003 amending Decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin.

Ramos, M., Munoz, P., Aranda, A., Rodrigue, I., Diaz, R. and Blanca, J., 2003. Detection of chloramphenicol residues in shrimp by liquid chromatography- Mass spectrometry. *Journal of chromatography B*, 791: 31 -38.

Weifen, W., Hong, L., Changhu, X. and Jamil. K., 2004. Elimination of chloramphenicol, sulphamethoxazole and oxytetracycline in shrimp, *Penaeus chinensis* following medicated-feed treatment. *Environment International*, 30: 367 – 373.

Tác giả chính: **Nguyễn Thanh Điền**

Email: nguyenthahdiennlu@gmail.com/ Tel: 0909678465.