

## XÁC ĐỊNH THỜI GIAN TỒN LƯU ENROFLOXACIN TRÊN CÁ TRA (*Pangasianodon hypophthalmus*)

Trần Minh Phú<sup>1</sup>, Đào Thị Hồng Sen, Đỗ Thị Thanh Hương<sup>1</sup>, Trần Thị Thanh Hiền<sup>1</sup>

Nuôi cá Tra thâm canh ở mật độ cao sẽ dẫn đến sự gia tăng sử dụng thuốc và hóa chất để kiểm soát môi trường và phòng và trị bệnh. Sử dụng thường xuyên và không tuân thủ nghiêm các qui định sẽ dẫn đến việc lạm dụng. Bộ Thủy Sản đã ra quyết định số 07/2005/QĐ-BTS ban hành ngày 24 tháng 2 năm 2005 quy định danh mục 17 loại kháng sinh cấm sử dụng và danh mục 34 loại hạn chế sử dụng trong đó có nhóm fluoroquinolones (FQs) và Quyết định số 26/2005/QĐ-BTS ban hành ngày 18/8/2005 của Bộ trưởng Bộ Thủy sản bổ sung nhóm kháng sinh fluoroquinolones vào danh mục cấm sử dụng trong sản xuất, kinh doanh thủy sản xuất khẩu vào thị trường Hoa Kỳ và Bắc Mỹ. Enrofloxacin (ENR) thuộc nhóm fluoroquinolones là kháng sinh được dùng phổ biến trong nông nghiệp, trong thủy sản và cả trong y học, có tác dụng rộng và tổng hợp trên cả 2 nhóm vi khuẩn gram âm và gram dương.

Theo quy định của Châu Âu – Commission Decision 2002/657/EC, giới hạn tồn lưu của ENR và Ciprofloxacin (CIP) là 100  $\mu$ g/kg trong sản phẩm thủy sản. Cơ quan quản lý thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ (Food and Drug Administration - FDA) không chấp nhận tồn lưu nhóm FQs trên sản phẩm thủy sản (Toussaint, *et al.*, 2005). Các nghiên cứu về tồn lưu ENR được thực hiện chủ yếu trên cá hồi (Dario, *et al.*, 2004, Stoffregen, *et al.*, 1997) và mực, tôm sú (Gore, *et al.*, 2005; Huỳnh Thị Tú, *et al.*, 2006 và Xu, *et al.*, 2006). Nghiên cứu này được tiến hành nhằm xác định thời gian tồn lưu enrofloxacin trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) làm cơ sở cho các nhà quản lý và người nuôi trong quản lý, sử dụng kháng sinh hợp lý.

Thí nghiệm được thực hiện trên 3 bể composite có thể tích 0,5m<sup>3</sup>/bể, mỗi bể bố trí 50 con cá tra/bể, cá có khối lượng trung bình 96±15g/con. Cá được cho ăn thức ăn có chứa kháng sinh enrofloxacin (98%) với liều lượng 1 g/1kg thức ăn liên tục trong 1 tuần và sau đó cho cá ăn với thức ăn không chứa kháng sinh trong 2 tháng. Lượng kháng sinh cá ăn vào tương đương 100mg kháng sinh/kg cá. Kháng sinh được trộn đều với bột mì trước khi phối trộn với các thành phần khác, thức ăn có hàm lượng đậm 26%.

Các yếu tố môi trường như nhiệt độ, oxy hòa tan, pH được đo mỗi ngày 2 lần trong suốt tuần cho ăn kháng sinh và định kỳ vào các ngày thu mẫu cá phân tích tồn lưu kháng sinh.

Cá được thu vào các thời điểm (i) trước khi cho cá ăn thức ăn kháng sinh, (ii) 3 ngày và 7 ngày sau khi bắt đầu cho cá ăn kháng sinh, (iii) 1, 4, 7, 15, 30 và 60 ngày sau khi cá dừng ăn thức ăn có chứa kháng sinh. Thu mẫu 3 con/bể, lấy mẫu cơ cá và trữ lạnh ở -80°C cho đến khi phân tích.

Mẫu được phân tích bằng hệ thống sắc ký lỏng khối phổ đã được hiệu chỉnh từ phòng thí nghiệm phân tích dư lượng Đại Học Liege, Bỉ. Kháng sinh được chiết tách từ cơ thịt cá bằng dung môi Acetonitrile và làm sạch bằng chiết tách pha rắn (Solid Phase Extraction - SPE), sử dụng cột chiết tách làm sạch SPE Strata C18-E (55 $\mu$ m, 70A) 500mg/6ml. Chất phân tích sau đó được hóa hơi dưới dòng khí nitơ và sau đó được hoà tan lại trong pha động chạy sắc ký. Chất phân tích sau khi chiết tách được xác định bằng hệ thống sắc ký lỏng cao áp (High Performance Liquid Chromatography) Agilent 1100 kết hợp đầu dò khối phổ (Mass Spectrometry Detector) API3000 với hệ thống nguồn ion hoá phun điện

<sup>1</sup> Bộ Môn Dinh Dưỡng và Chế Biến thủy sản, Khoa Thủy sản, Đại học Cần Thơ.

tử. Cột sắc ký sử dụng là Gemini 3u C6 Phenyl 110A (3x150 mm, 3 μm), kết hợp với cột bảo vệ Gemini C6 Phenyl guard column (2x4 mm, 3 μm) từ Phenomenex. Pha động chạy sắc ký là Acetonitrile và nước được điều chỉnh đến pH đạt 2,5 bằng axit formic. Thể tích tiêm mẫu: 20 μl, tốc độ dòng: 500 μl/phút, nhiệt độ cột: 25°C, nhiệt độ nguồn 450°C. Mỗi chất phân tích được xác định dựa trên tỷ lệ khối lượng trên điện tích và các mảnh đặc trưng cho mỗi chất phân tích. Giới hạn định lượng của phương pháp (Limit of Quantification - LOQ) là 2μg/kg

Kết quả các yếu tố môi trường bề thí nghiệm (nhiệt độ, oxy hòa tan và pH) dao động trong khoảng thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của cá. Tùy theo nghiệm thức mà nhiệt độ trung bình trong ngày dao động trong khoảng 28±0,3 đến 30±0,5°C, oxy hoà tan từ 4,6±0,3 đến 5,5±0,4 mg/l và pH từ 7,8±0,2 đến 8,0±0,1.

Kết quả phân tích mẫu thức ăn thì hàm lượng ENR sau khi ép viên là 10,6 mg/kg thức ăn. Sau 7 ngày cho cá ăn thức ăn thí nghiệm thì hàm lượng kháng sinh tồn lưu trong cơ cá tra được thể hiện trong bảng 1.

**Bảng 1: Sự tồn lưu kháng sinh trên cá tra trong thời gian một tuần cho ăn kháng sinh**

| Thời gian cho cá ăn kháng sinh | Tồn lưu kháng sinh trên cơ cá Tra (μg/kg ) |               |
|--------------------------------|--|---------------|
|                                | Enrofloxacin                               | Ciprofloxacin |
| Ban đầu                        | <LOQ                                       | <LOQ          |
| 3 ngày                         | 1.108±789                                  | 70,8±34,7     |
| 7 ngày                         | 2.796±482                                  | 86,8±37,9     |

LOQ: giới hạn phát hiện của phương pháp phân tích, LOQ=2ppb

Kết quả phân tích mẫu cá trước khi cho ăn kháng sinh không phát hiện tồn lưu ENR và CIP, giới hạn định lượng LOQ 2μg/kg. Sau 1 tuần cho cá ăn thức ăn có chứa kháng sinh thì hàm lượng ENR tích lũy trong cơ tăng dần từ ngày thứ 3 (1.108±789μg/kg) đến ngày thứ 7 (2.796 ± 482 μg/kg). Trong quá trình cá ăn thức ăn có chứa ENR, đã có sự chuyển hoá của ENR thành CIP với hàm lượng 70,8±34,7 μg/kg sau 3 ngày cho ăn thức ăn có chứa kháng sinh và đạt 86,8 ± 37,9 μg/kg sau 7 ngày. Sau 60 ngày cho cá ăn thức ăn không có kháng sinh đã cho thấy có sự đào thải kháng sinh từ trong cá. Kết quả phân tích ở Bảng 2 cho thấy lượng ENR và CIP trong cơ cá giảm dần theo thời gian kể từ khi kết thúc gây nhiễm.

**Bảng 2: Sự tồn lưu kháng sinh trên cá Tra sau 60 ngày ngưng cho ăn kháng sinh**

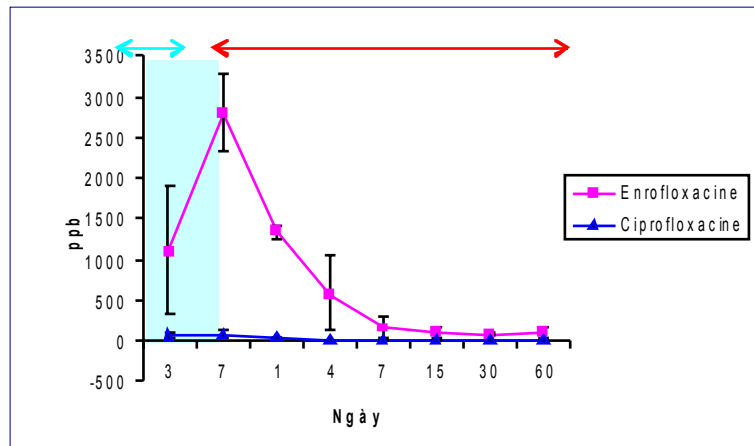
| Thời gian ngưng cho cá ăn kháng sinh | Tồn lưu kháng sinh trên cơ cá Tra (μg/kg ) |               |
|--------------------------------------|--|---------------|
|                                      | Enrofloxacin                               | Ciprofloxacin |
| 1 ngày                               | 1.347±76                                   | 39,6±14,4     |
| 4 ngày                               | 576±460                                    | 7,24±8,77     |
| 7 ngày                               | 158±121                                    | 6,23±2,56     |
| 15 ngày                              | 101±78,9                                   | 3,24±2,25     |
| 30 ngày                              | 89,0±5,21                                  | 3,05±1,40     |
| 60 ngày                              | 97,9±66,5                                  | 2,03±1,63     |

LOQ: giới hạn phát hiện của phương pháp phân tích, LOQ=2ppb

Hàm lượng ENR còn lại sau 60 ngày ngưng cho ăn kháng sinh là 97,9±66,5 μg/kg, giảm 96,4% so với lượng tích lũy gây nhiễm ban đầu. Sự đào thải diễn ra chậm dần sau 15

ngày ngưng cho ăn kháng sinh. Hàm lượng ENR trong cá hầu như không đào thải được nhiều từ ngày thứ 15 đến ngày thứ 60. Tương tự hàm lượng CIP còn lại sau 60 ngày là  $2,03 \pm 1,63 \mu\text{g}/\text{kg}$  giảm 97,6% so với lượng đã chuyển hóa được trong 7 ngày gây nhiễm.

Sự tồn lưu ENR và CIP được thể hiện qua hình 1 cho thấy hàm lượng ENR và CIP tăng dần và đạt cực đại ở cuối thời gian gây nhiễm. Kết thúc quá trình gây nhiễm, hàm lượng kháng sinh trong cơ cá giảm dần theo thời gian và vẫn tồn lưu ở hàm lượng cao sau 2 tháng kết thúc gây nhiễm



**Hình 1:** Sự tồn lưu kháng sinh trên cá tra trong thời gian thí nghiệm (đoạn mũi tên màu xanh là giai đoạn cho cá ăn kháng sinh, đoạn mũi tên màu đỏ là không cho cá ăn có kháng sinh)

Kết quả nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu của Xu, *et al.* (2006) trên cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) và tôm thẻ Trung Quốc (*Penaeus chinensis*). Sau 7 ngày cho ăn kháng sinh mức tồn lưu cao nhất của ENR trên cơ cá rô phi là  $3.610 \mu\text{g}/\text{kg}$ , ở gan  $5.960 \mu\text{g}/\text{kg}$ . Trong khi đó lượng CIP được chuyển hóa ở cơ là  $220 \mu\text{g}/\text{kg}$ , ở gan là  $350 \mu\text{g}/\text{kg}$ . Ở tôm thẻ Trung Quốc (*Penaeus chinensis*) lượng tồn lưu của ENR và CIP trên cơ là  $1.680 \mu\text{g}/\text{kg}$  và  $70 \mu\text{g}/\text{kg}$ . Đối với cá tra thí nghiệm, sau 7 ngày gây nhiễm ENR, hàm lượng ENR tồn lưu trong cơ thịt là  $2.796 \mu\text{g}/\text{kg}$  và CIP là  $86,8 \mu\text{g}/\text{kg}$ .

Các nghiên cứu về sự tồn lưu ENR trên cá đã được thực hiện chủ yếu là nhóm cá hồi. Theo Dario, *et al.* (2004) nhận thấy thời gian đào thải của ENR trong cá hồi chậm (bao gồm cả phần thịt và da cá). Cá hồi được cho ăn thức ăn có chứa ENR với liều lượng  $10 \text{ mg}/\text{kg}$  khối lượng cơ thể và cho ăn liên tục trong 5 ngày. Sau 30 ngày ngưng cho cá ăn thức ăn có ENR, mức tồn lưu của ENR là  $240 \mu\text{g}/\text{kg}$  và sau 59 ngày là  $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ . Tồn lưu ENR trên cá hồi cho kết quả tương tự như cá Tra thí nghiệm, sau 60 ngày không cho ăn thức ăn chứa kháng sinh, hàm lượng ENR tồn lưu trong cơ là  $97,9 \mu\text{g}/\text{kg}$ . Trong khi đó Stoffregen, *et al.* (1997) nhận xét khi cá hồi nuôi trong điều kiện nhiệt độ  $6^\circ\text{C}$  và cho ăn thức ăn có chứa ENR  $10 \text{ mg}/\text{kg}$  khối lượng cơ thể liên tục trong 10 ngày thì sau 60 ngày ngưng sử dụng, mức tồn lưu của ENR trong cá là  $6 \mu\text{g}/\text{kg}$ . Kết quả cũng chỉ ra ENR có khả năng tích lũy trên da cá hồi và thời gian đào thải chậm hơn.

Các nghiên cứu về sự đào thải ENR trên các đối tượng khác cho thấy ENR đào thải rất nhanh. Gore, *et al.* (2005) nghiên cứu thời gian tích lũy và đào thải của ENR trên cá mực khối lượng thân từ  $95,7$  đến  $129 \text{ g}$ , với liều dùng là  $10 \text{ mg}/\text{kg}$  khối lượng cơ thể bằng

phương pháp tiêm một lần trực tiếp vào cơ thể và thu mẫu máu sau 1, 3, 6, 24 và 48 ngày. Kết quả sau 1 giờ tiêm thì lượng ENR cao nhất ( $10,9\mu\text{g/ml}$  máu). Tuy nhiên không phát hiện tồn lưu của ENR cũng như CIP trong máu cá mực sau khi tiêm 24 giờ. Thời gian đào thải của ENR trong cá mực là rất nhanh.

Đối với tôm sú *Penaeus monodon* khi khảo sát sự tồn lưu ENR cho thấy sau khi ngưng cho ăn kháng sinh thì mức độ tồn lưu cao nhất là  $441\mu\text{g/kg}$  và cũng sau 7 ngày chỉ còn lại  $17,3\mu\text{g/kg}$  đến ngày 28 thì mức độ tồn lưu còn lại là  $10\mu\text{g/kg}$  (Huỳnh Thị Tú, *et al.*, 2006). Sự đào thải của ENR trong tôm rất nhanh. Như vậy tồn lưu ENR trên cá Tra trong thí nghiệm này dài hơn so với các đối tượng khác.

Cá ăn thức ăn có kháng sinh ENR với lượng  $10,6\text{ mg/kg}$  thức ăn cho ăn trong 7 ngày, mức tồn lưu kháng sinh ENR trong cá là  $2.796\pm 482\mu\text{g/kg}$ . Sau 60 ngày ngưng cho ăn thức ăn có chứa kháng sinh, tồn lưu ENR trong cá  $97,9\pm 66,5\mu\text{g/kg}$  cao hơn theo quy định của Châu Âu (Commission Decision 2002/657/EC), giới hạn tồn lưu của ENR và CIP là  $100\mu\text{g/kg}$  trong sản phẩm thủy sản

Có sự chuyển hoá ENR thành CIP  $86,8\pm 37,9\mu\text{g/kg}$  sau 7 ngày cho cá ăn kháng sinh ENR. Hàm lượng CIP giảm  $97,6\%$  so với lượng chuyển hoá ban đầu trong thời gian 2 tháng ngừng cho ăn kháng sinh.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Dario, L., F. Laura., G. Emilio., P. Elisabeth., M. Luigi., Z. Anna., C. Ettore. 2004. Long depletion time of enrofloxacin in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Antimicrobial Agents and Chemotherapy 10: 3912-3917
- Gore, S.R., C. Harms., B. Kukanich., J. Forsythe, G.A. Lewbart and M.G. Papich. 2005. Enrofloxacin pharmacokinetics in the European cuttle fish, *Sepia officinalis*, after a single i.v. injection and bath administration. J.Vet. Pharmacol. Therap. 28:433-439.
- Huỳnh Thị Tú, Nguyễn Thanh Phương, Frédéric Slivetre, Caroline Douny, Châu Tài Tảo, Guy Maghuin-Rogister and Patrick Kestermont. 2006. Khảo sát tình hình sử dụng thuốc và hoá chất trong nuôi tôm và sự tồn lưu của Enrofloxacin và Furazolidone trong tôm sú. Tạp chí Khoa Học Trường Đại Học Cần Thơ, 04/2006: 70-78.
- 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.
- 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.
- Bộ Thủy sản. 2005. Quyết định số 26/2005/QĐ-BTS ngày 18/8/2005 của Bộ trưởng Bộ thủy sản về việc bổ sung danh mục kháng sinh nhóm Fluorquinolones cấm sử dụng trong sản xuất, kinh doanh thủy sản xuất khẩu vào thị trường Mỹ và Bắc Mỹ.
- Stoffregen, D.A., Wooster, G.A., Bustos, P.S., Bower, P.R., Babish, J.G. 1997. Multiple route and dose pharmacokinetics of enrofloxacin in juvenile Atlantic salmon. J.Vet. Pharmacol. Therap.20: 111-123.
- Toussaint, B., M. Chedin, G. Bordin and A.R. Rodriguez. 2005. Determination of (fluoro) quinolone antibiotic residues in pig kidney using liquid chromatography – tandem mass spectrometry. Sciencedirect - Journal of Chromatography A. Available online 14 March 2005
- Xu, W., Xiaobin Zhu, Xinting Wang, Liping Deng and Gan Zhang. 2005. Residues of enrofloxacin, furazolidone and their metabolites in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Sciencedirect – Journal of Chromatography A. Available online 15 December 2005