

ĐỊNH LƯỢNG TỒN DƯ SULFADIMIDINE VÀ SULFAMETHOXAZOLE TRONG NƯỚC THẢI TẠI CÁC GIA TRẠI LỢN Ở HUYỆN VŨ THƯ, TỈNH THÁI BÌNH BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Vũ Thị Minh Thư^{1*}, Nguyễn Tiến An¹,
Nguyễn Tô Bảo Hoàng²

TÓM TẮT

Mục tiêu: Định lượng tồn dư kháng sinh Sulfadimidine (SDD) và Sulfamethoxazole (SMX) trong nước thải tại các gia trại lợn thuộc xã Nguyên Xá và xã Song An thuộc huyện Vũ Thư, tỉnh Thái Bình bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

Phương pháp nghiên cứu: Nghiên cứu mô tả cắt ngang, được tiến hành từ tháng 9 năm 2016 đến tháng 7 năm 2017. Các kháng sinh SDD và SMX trong 24 mẫu nước thải được tách chiết và làm giàu bằng phương pháp chiết pha rắn (SPE), sau đó lượng kháng sinh tồn dư trong các mẫu được định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

Kết quả nghiên cứu: Tỷ lệ mẫu nước thải thu thập tại các gia trại lợn có tồn dư kháng sinh SMX hoặc/và SDD là 25,0% (6/24); trong đó tỷ lệ mẫu có tồn dư SMX là 16,7% (4/24), tỷ lệ mẫu có tồn dư SDD là 20,8% (5/24) và tỷ lệ mẫu tồn dư cả SDD và SMX là 12,5% (3/24).

Kết luận: Nghiên cứu cho thấy tỷ lệ ô nhiễm kháng sinh trong mẫu nước thải tại gia trại lợn tại Vũ Thư, Thái Bình là khá cao, do đó cần có các biện pháp can thiệp phù hợp nhằm làm giảm tình trạng ô nhiễm kháng sinh trong chăn nuôi lợn tại Thái Bình.

Từ khóa: Sulfadimidine, Sulfamethoxazole, chiết pha rắn, HPLC

QUANTIFICATION OF SULFADIMIDINE AND SULFAMETHOXAZOLE RESIDUES IN WASTEWATER IN PIG FARMS IN VU THU DISTRICT, THAI BINH PROVINCE BY A HIGHPERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY ASSAY

ABSTRACT

Objective: To quantify Sulfadimidine (SDD) and Sulfamethoxazole (SMX) residues in wastewater in

1. Trường Đại học Y Dược Thái Bình

2. Bệnh viện huyện Củ Chi

*Tác giả liên hệ: Vũ Thị Minh Thư

Email: vuminhthuvt@gmail.com

Ngày nhận bài: 25/01/2024

Ngày phản biện: 29/05/2024

Ngày duyệt bài: 31/05/2024

pig farms in Nguyen Xa commune and Song An commune of Vu Thu district, Thai Binh province.

Methods: This is a cross-sectional descriptive study, conducted from September 2016 to July 2017. Antibiotics SDD and SMX in 24 wastewater samples were extracted and enriched using a solid-phase extraction method (SPE), then the amount of antibiotic residue in the samples was quantified using a highperformance liquid chromatography (HPLC) assay.

Results: The rate of wastewater samples collected from pig farms contaminated with SMX or/and SDD residues was 25.0% (6/24); in which the rates of samples contaminated with SMX, SDD and SMX/SDD residue were 16.7% (4/24), 20.8% (5/24) and 12. 5% (3/24), respectively.

Conclusion: The study showed that the rate of wastewater samples from pig farms in Vu Thu, Thai Binh contaminated with SMX and SDD was quite high, so appropriate interventions were needed to reduce pollution of antibiotic in pig farming in Thai Binh.

Keywords: Sulfadimidine, Sulfamethoxazole, solid-phase extraction, HPLC

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sulfonamids là một nhóm thuốc kháng sinh tổng hợp đóng một vai trò quan trọng và hiệu quả trong việc hạn chế sự nhiễm trùng do vi khuẩn và vi sinh vật trong hệ thống tiêu hóa của vật nuôi. Vì vậy chúng được sử dụng trong thức ăn chăn nuôi nhằm kích thích tăng trưởng, ngăn chặn và điều trị một loạt các bệnh ở gia súc, gia cầm như các bệnh về tiêu hóa hay hô hấp... Sulfadimidine (SDD) and Sulfamethoxazole (SMX) thuộc họ sulfonamids có phổ kháng khuẩn khá rộng được sử dụng rộng rãi trong thú y do ưu điểm về giá thành và hiệu quả trị liệu. Đây là nhóm kháng sinh được sử dụng lâu nhất, chúng được sử dụng để trị bệnh nhiễm trùng ở nhiều cơ quan nội tạng. SMX tan trong nước, ở các quốc gia đang phát triển thường được dùng để trị bệnh ở người và khi đào thải ra bên ngoài có khoảng 15% SMX ở dạng ban đầu. SMX tồn lưu lâu trong môi trường, thời gian bán hủy lớn, trong

hệ thống xử lý phân lợn ở điều kiện yếm khí thời gian phân huỷ hoàn toàn SMX là 34 ngày, trong thiết bị xử lý đơn giản SMX bị loại bỏ không đáng kể. Việc sử dụng kháng sinh không hợp lý gây nguy cơ kháng thuốc làm giảm sức đề kháng của vật nuôi, thải ra môi trường gây ảnh hưởng đến sức khỏe con người. Khi người tiêu dùng sử dụng nguồn nhiễm dư lượng kháng sinh Sulfonamids, sau một thời gian chúng sẽ tích tụ trong cơ thể, có thể gây hiện tượng kháng kháng sinh ở người, làm mất đi cả vi khuẩn có lợi, gây viêm thận và sỏi thận. Hiện tượng kháng kháng sinh được Tổ chức Y tế Thế giới xếp là một trong ba mối đe dọa nghiêm trọng nhất đối với sức khỏe cộng đồng trong thế kỷ XXI. Ở Việt Nam khoảng 5% kháng sinh được sử dụng trong nông nghiệp. Tình trạng tồn dư kháng sinh trong thực phẩm, nhất là thủy sản, ở mức độ nghiêm trọng [1]. Trong số các nhóm ô nhiễm hoá học mới nói chung, kháng sinh được xếp vào nhóm nguy cơ hàng đầu.

Trên thế giới việc kiểm định hàm lượng kháng sinh trong nước thải phải được làm thường xuyên. Tuy nhiên, tại Việt Nam việc kiểm định kháng sinh trong nước thải chưa được nghiên cứu nhiều và chưa đưa ra được tiêu chuẩn cụ thể. Huyện Vũ Thư, tỉnh Thái Bình là một địa điểm gần trung tâm thành phố và cung cấp nông sản và thủy sản, do đó chúng tôi thực hiện nghiên cứu: “Định lượng tồn dư Sulfadimidine và Sulfamethoxazole trong nước thải tại các gia trại lợn ở huyện Vũ Thư, tỉnh Thái Bình bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao” với mục tiêu: xác định được tồn dư kháng sinh SDD và SMX trong nước thải của các gia trại lợn tại hai xã Nguyên Xá và Song An thuộc huyện Vũ Thư, tỉnh Thái Bình bằng phương pháp HPLC.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, địa điểm và thời gian nghiên cứu

* Đối tượng nghiên cứu

- Các chất chuẩn Sulfachlorpyridazine (SCP), Sulfamethoxazole (SMX) và Sulfadimidine (SDD) được sử dụng để xây dựng đường chuẩn trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao.

- Mẫu nước thải tại các gia trại lợn thuộc 2 xã Nguyên Xá và Song An. Số mẫu nước thải được thu thập tại mỗi xã là 12 mẫu, tổng số 24 mẫu.

* Địa điểm nghiên cứu

- Nghiên cứu được thực hiện tại xã Nguyên Xá và Song An thuộc huyện Vũ Thư, tỉnh Thái Bình. Hai xã này nằm cạnh nhau và giáp với đê sông

Hồng, có điều kiện kinh tế, xã hội, thổ nhưỡng... tương tự như nhau.

- Kỹ thuật xét nghiệm định lượng SMX và SDD được thực hiện trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC (Shimadzu, Nhật Bản) tại Trung tâm Dịch vụ Khoa học kỹ thuật Y Dược, Trường Đại học Y Dược Thái Bình.

* Thời gian nghiên cứu

Từ tháng 9 năm 2016 đến tháng 7 năm 2017.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu theo phương pháp mô tả qua cuộc điều tra ngang.

Kỹ thuật lấy mẫu theo quy chuẩn của Việt Nam [2]

Quy trình xử lý mẫu bằng phương pháp chiết pha rắn như sau: (theo quy chuẩn Việt Nam [3])

Mẫu nước phân tích (500 mL).

+ Lọc qua bông loại tạp lớn, qua giấy lọc loại tạp nhỏ

+ Thêm 100 ml chất nội chuẩn sulfachlorpyridazine (SCP) với nồng độ 1 mg/l

+ Điều chỉnh pH = 3 bằng dung dịch HCl 1M

+ Lắp cột SPE Oasis HLB (6 ml, 150 mg, 30 mm) tốc độ dòng 10 – 15 ml/min

+ Hoạt hóa cột bằng 6 ml metanol điều chỉnh cột với 10 ml nước cất có pH 3.0

+ Chuyển toàn bộ mẫu phân tích lên cột chiết SPE

+ Loại tạp bằng 100 mL nước khử ion được điều chỉnh pH 3.0 bởi HCl 1M

+ Kiểm tra cột khô (hết nước) bằng xylanh

+ Rửa giải với 10 ml acetonitrile (AcCN), chuyển dịch chiết vào 1 ống nghiệm sạch

+ Thổi khô dịch chiết bằng khí nitơ (làm giàu và sạch mẫu)

+ Hòa tan mẫu thu được bởi 1,0 ml dung môi ($H_2O/AcCN$: 85/15 v/v)

+ Lọc qua màng lọc PTFE (tiếp tục làm sạch)

Mẫu nước sau khi được xử lý sạch và làm giàu (lên 300 lần) bằng kỹ thuật chiết pha rắn SPE được phân tích bằng HPLC với detector huỳnh quang. Quy trình chạy mẫu trên máy HPLC như sau:

Bước 1: Thực hiện dẫn xuất hóa

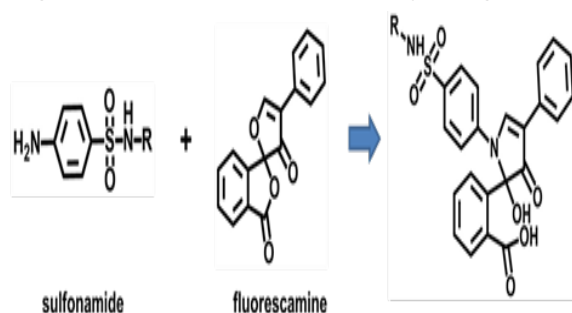
Thêm vào 50 μ L mẫu nước phân tích:

+ 50 μ L sodium acetate 3,5M (pH=3,0)

+ 20 μ L fluorescamine 0,2% trong acetone

+ Lắc trộn kỹ

+ Bọc mẫu trong giấy bạc để tránh ánh sáng, giữ ở nhiệt độ phòng khoảng 20 phút, sau đó tiến hành chạy HPLC. Sơ đồ dẫn xuất hóa các sulfonamide bằng fluorescamine được trình bày trong hình 1.



Hình 1. Sơ đồ dẫn xuất hóa sulfonamide bằng fluorescamine

Bước 2: Thực hiện chạy mẫu trên HPLC với điều kiện:

- + Cột: ODS (Inertsil ODS-3, 4,6×150mm, 5 μ m, GL sciences)
- + Nhiệt độ: 55°C
- + Tốc độ dòng: 1.0mL/min
- + Thể tích bơm mẫu: 10 μ L
- + Pha động: 2% acetic acid/acetonitrile (55/45)
- + Detection: Fluorescence
- + Excitation: 405 nm, Emission: 495 nm

Xử lý số liệu theo phương pháp thống kê toán học bằng phần mềm EPI DATA 3.1 và phân tích kết quả bằng chương trình SPSS 20.0.

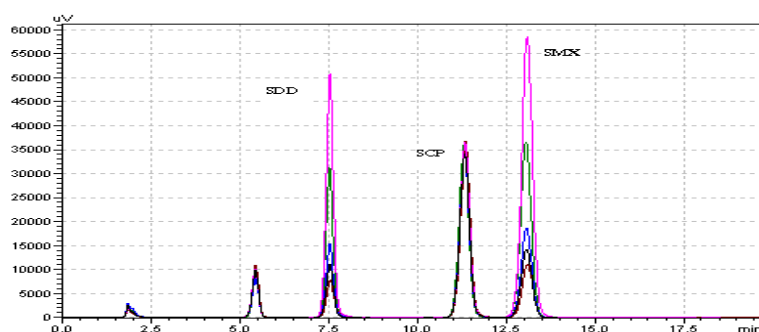
2.3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu tuân thủ đúng theo Quyết định số 56/QĐ – YDTB ngày 10/01/2023 của HĐKH về việc thành lập Hội đồng đạo đức trường Đại học Y Dược Thái Bình.

III. KẾT QUẢ

3.1. Khảo sát khoảng tuyến tính và lập đường chuẩn

Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của SDD, SCP và SMX trong khoảng nồng độ từ 5 đến 100ppb được trình bày trên hình 2



Hình 2. Chạy sắc ký chất chuẩn SDD, SCP và SMX tại nồng độ 5ppb, 10ppb, 20ppb, 50ppb, 100ppb

Với khoảng nồng độ đã khảo sát thì các pic sắc ký có độ phân giải khá tốt, độ nhạy tốt, không có hiện tượng chen lấn pic, tại các nồng độ khác nhau được chạy trong cùng một điều kiện cho kết quả trùng khít rất cao, sắc đồ quan sát dễ dàng.

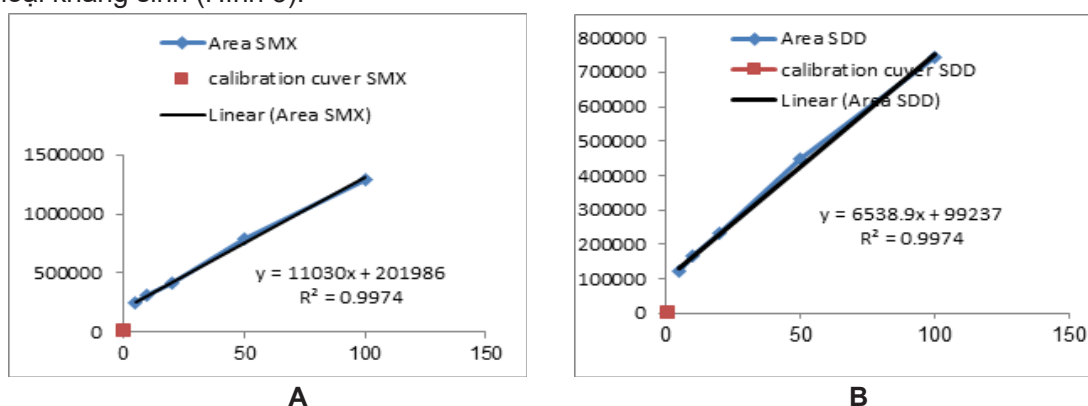
Tiến hành đo diện tích pic của chất chuẩn nội SCP, SDD và SMX tại nồng độ 5ppb, 10ppb, 20ppb, 50ppb, 100ppb thu được kết quả như trong bảng 1.

Bảng 1. Sự phụ thuộc của diện tích S_{pic} vào nồng độ chất phân tích

Nồng độ (ppb)	Lần đo	S_{pic} (mAu.s)		
		SCP	SDD	SMX
5ppb	Lần 1	712522,9	125362,1	246962,6
	Lần 2	708092,8	114885,8	239367,2
	Trung bình	710307,9	120124,0	243164,9
10ppb	Lần 1	669374,7	165731,8	314039,5
	Lần 2	686390,0	163883,2	318351,4
	Trung bình	677882,4	164807,5	316190,5

Nồng độ (ppb)	Lần đo	S _{pic} (mAu.s)		
		SCP	SDD	SMX
20ppb	Lần 1	660582,9	232061,8	407769,8
	Lần 2	655680,6	229110,3	415743,9
	Trung bình	658131,8	230586,1	411756,9
50ppb	Lần 1	705833,4	453995,7	798459,2
	Lần 2	689561,7	440756,6	782286,3
	Trung bình	697697,6	447376,2	790372,8
100ppb	Lần 1	715808,8	750773,3	1288660,7
	Lần 2	712030,1	735197,9	1289479,6
	Trung bình	713919,45	742985,6	1289070,2

Dựa vào kết quả đo diện tích peak của SDD và SMX trong bảng 1 để tiến hành xây dựng đường chuẩn cho mỗi loại kháng sinh (Hình 3).



Hình 3. Đường chuẩn của SMX (A) và SDD (B) trong khoảng nồng độ từ 5 - 100 ppb

Các kết quả trong hình 3 cho thấy kết quả đo diện tích peak trên hệ thống HPLC của hai loại kháng sinh đều tỷ lệ thuận với nồng độ chuẩn của loại kháng sinh tương ứng với hệ số tương quan của các đường chuẩn đều đạt $R^2 > 99\%$. Phương trình biểu diễn đường chuẩn của SMX là: $Y = 11030X + 201986$ và của SDD là: $Y = 6538,9X + 99237$.

3.2. Định lượng tồn dư SDD và SMX trong mẫu nước thải

Các mẫu nước thải sau khi đã xử lý bằng phương pháp chiết pha rắn (SPE) được tiến hành định lượng tồn dư kháng sinh trên hệ thống HPLC trong các điều kiện đã trình bày ở phần thực nghiệm. Kết quả đo diện tích peak và dư lượng kháng sinh tương ứng được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2. Kết quả định lượng tồn dư SDD và SMX trong mẫu nước thải

STT	SDD		SMX	
	Diện tích peak (Asb)	Nồng độ (ppb)	Diện tích peak (Asb)	Nồng độ (ppb)
1	KPH	-	1373362,1	106
2	392680,3	44,9	280886,6	7,1
3	KPH	-	KPH	-
4	KPH	-	KPH	-
5	KPH	-	KPH	-
6	851641,3	115,0	961821,6	68,9
7	KPH	-	KPH	-
8	219994,7	18,5	KPH	-
9	KPH	-	KPH	-
10	KPH	-	KPH	-

STT	SDD		SMX	
	Diện tích peak (Asb)	Nồng độ (ppb)	Diện tích peak (Asb)	Nồng độ (ppb)
11	KPH	-	KPH	-
12	KPH	-	KPH	-
13	KPH	-	KPH	-
14	KPH	-	KPH	-
15	119480,0	3,1	KPH	-
16	KPH	-	KPH	-
17	KPH	-	KPH	-
18	KPH	-	KPH	-
19	KPH	-	KPH	-
20	KPH	-	KPH	-
21	KPH	-	KPH	-
22	KPH	-	KPH	-
23	636583,1	78,6	996765,3	72,1
24	KPH	-	KPH	-

* KPH: không phát hiện (dưới giới hạn định lượng của thiết bị đo)

Kết quả trong bảng 2 cho thấy, trong 24 mẫu nước thải được định lượng dư lượng kháng sinh SDD và SMX thì có 5 mẫu có nước thải chăn nuôi bị nhiễm SDD chiếm tỷ lệ là 20,8%; có 4 mẫu nước thải chăn nuôi bị nhiễm SMX chiếm tỷ lệ là 16,7%, có 3 mẫu nước thải chăn nuôi bị nhiễm cả hai kháng sinh SMX và SDD chiếm tỷ lệ 12,5%.

IV. BÀN LUẬN

Hiện nay, để xác định các chất hữu cơ có hàm lượng nhỏ cỡ ppb, phương pháp HPLC thường được sử dụng và cho kết quả có độ tin cậy cao. Theo phương pháp này, kỹ thuật đường chuẩn được sử dụng vì có thể phân tích số lượng mẫu lớn trong thời gian ngắn. Đối với mỗi nhóm chất phân tích, việc tìm ra khoảng nồng độ ở đó có sự phụ thuộc tuyến tính của diện tích pic vào nồng độ là cần thiết, từ đó thiết lập được đường chuẩn dùng cho phép đo định lượng. Trong nghiên cứu này, khi thử nghiệm với các mẫu chuẩn, kết quả cho thấy sự chênh lệch giữa hai lần đo của cùng một nồng độ là rất nhỏ, hầu hết nằm trong khoảng từ 1 - 5% (bảng 1). Điều này cho thấy kết quả định lượng SDD và SMX bằng kỹ thuật HPLC có độ chính xác khá cao. Kết quả xây dựng đường chuẩn đối với SMX và SDD cho thấy trong khoảng nồng độ từ 5 – 100 ppb, có sự tương quan chặt chẽ giữa diện tích peak đo được với nồng độ chất chuẩn ($R^2 > 0,99$). Do đó, có thể sử dụng đường chuẩn này để xác định mẫu có hàm lượng chất phân tích có nồng độ từ 5 - 100 ppb. Trường hợp mẫu có nồng độ nằm ngoài phạm vi trên, có thể sử dụng phương pháp làm giàu hoặc pha loãng để có thể phân tích mẫu dựa vào đường chuẩn đã xây dựng được.

Mẫu phân tích là mẫu nước thải lấy từ các gia trại lợn nên thành phần mẫu rất phức tạp. Để loại bỏ ảnh hưởng của những yếu tố trong mẫu đến kết quả định lượng các chất kháng sinh, chúng tôi đã sử dụng một chất nội chuẩn có cấu tạo gần giống với các chất kháng sinh cần xác định là SCP. Peak sắc ký trên máy HPLC gần giống với peak sắc ký của SMX và SDD, diện tích peak của SCP tỷ lệ tuyến tính với nồng độ SCP trong mẫu. Thêm một lượng như nhau (100 ml chất SCP nồng độ 1 mg/l) vào các mẫu phân tích và mẫu chuẩn đều cho kết quả trên sắc ký đồ là nằm giữa peak của SMX và SDD, diện tích peak của SCP thu được ở các mẫu chuẩn và mẫu phân tích đều tương đương nhau, không sai khác nhiều, chứng tỏ diện tích peak tỷ lệ tuyến tính với nồng độ chất nội chuẩn, kết quả đo ít bị ảnh hưởng khi thay đổi thành phần mẫu, đạt yêu cầu của chất nội chuẩn.

Áp dụng đường chuẩn xây dựng ở trên để phân tích các mẫu nước thải cho thấy: có 4 mẫu nước ao lấy tại các gia đình có chăn nuôi lợn trong tổng số 24 mẫu phân tích (chiếm 16,7%) cho kết quả có tồn dư kháng sinh SMX, mẫu dương tính có nồng độ cao nhất là 106 ppb, nhỏ nhất là 7,1 ppb. Số lượng mẫu nước thải nhiễm SMX tuy không

nhiều song dư lượng kháng sinh SMX trong các mẫu nước thải trong nghiên cứu này cao hơn gấp hàng nghìn lần so với dư lượng kháng sinh SMX trong nước sông ở Nhật Bản năm 2008 (12,35 ppt) [4], nhưng tương đương với dư lượng SMX ở sông Hàn tại Hàn Quốc là 82 ppb năm 2015 [5]. Kết quả cũng cho thấy có 5 trong số 24 mẫu nước thải (chiếm 20,8%) có tồn dư kháng sinh SDD với giá trị cao nhất là 115 ppb, giá trị dương tính nhỏ nhất là 3,1 ppb. Số lượng mẫu nước có dư lượng kháng sinh SDD tuy không nhiều song dư lượng kháng sinh tồn dư trong các mẫu nước thải cũng cao hơn nhiều lần so với dư lượng kháng sinh SDD có trong một nghiên cứu được thực hiện ở Trung Quốc năm 2016 (15,5 ppb) [6]. Số mẫu nước thải có tồn dư cả hai loại kháng sinh SMX và SDD trong nước thải là 3/24 (chiếm 12,5%).

Trong nghiên cứu này mặc dù số lượng mẫu phân tích chưa đủ lớn nhưng nghiên cứu đã cho thấy tình trạng tồn dư kháng sinh trong nước thải chăn nuôi lợn ở Vũ Thư, Thái Bình khá phổ biến. Do đó, cần phải áp dụng các biện pháp can thiệp phù hợp nhằm làm giảm tình trạng ô nhiễm kháng sinh trong chăn nuôi tại Thái Bình.

V. KẾT LUẬN

Đã xây dựng được đường chuẩn để xác định kháng sinh SDD và SMX theo phương pháp HPLC. Ứng dụng đường chuẩn này để xác định tồn dư kháng sinh SDD và SMX trong nước thải tại các gia trại lợn thuộc 2 xã Nguyên Xá và Song An thuộc huyện Vũ Thư, tỉnh Thái Bình cho thấy tỷ lệ mẫu nước thải bị nhiễm SDD là 20,8%, bị nhiễm SMX là 16,7% và bị nhiễm cả hai loại kháng sinh SDD và SMX là 12,5%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Dương Hồng Anh, Phạm Ngọc Hà (2015)**, Xác định dư lượng kháng sinh Floquinolon trong nước, bùn và tôm tại khu vực nuôi tôm quảng canh Giao An, Giao Thủy, Nam Định. VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology, [S.l.], V.31, N.1, ISSN 2588-1140.
2. **TCVN 5994 – 1995, ISO 5667-4: 1987** Chất lượng nước lấy mẫu - Hướng dẫn lấy mẫu ở hồ ao tự nhiên và nhân tạo.
3. **TCVN 8345-2010** “Thủy sản và sản phẩm thủy sản. Xác định dư lượng sulfonamide-Phương pháp Sắc ký lỏng hiệu năng cao”.
4. **Yoko Yamagishi, thermo Fisher Scientific, Yokohama, Japan (2008)**; Analysis of Sulfonamides in River Water using Equan, an Online concentration analysis system, Part of Thermo Fisher Scientific, Application Note: 435.
4. **Phạm Thị Thanh Yên**, Nghiên cứu đánh giá dư lượng một số chất kháng sinh trong nước và động vật thủy sinh trong một số hồ Hà nội, Luận án tiến sĩ kỹ thuật môi trường, 2017.
6. **Yanbin Lu, Zhuo Cheng, Chunping Liu, Xiaoji Cao (2016)**, Determination of Sulfonamides in Fish Using a Modified QuEChERS Extraction Coupled with Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, Food Anal. Methods 9:1857–1866