

PHÂN TÍCH ĐỒNG THỜI CÁC HỢP CHẤT AUXIN VÀ GIBBERELLIN TRONG RAU XANH

Đến tòa soạn 18-02-2021

Nguyen Quang Trung, Le Van Nhan

Center for Research and Technology Transfer – Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

PROCESS OF SIMULTANEOUS ANALYSIS OF AUXIN AND GIBBERELLIN IN VEGETABLES

In this study, auxin and gibberellin compounds in vegetables were simultaneous analyzed using HPLC-ESI-MS². The method shows good linearity for all compounds including IAA, IBA, ICA, IPA, GA₃, GA₄, and GA₇ with $R^2 > 0.996$. The method detection limit (MDL) and method quantification limit (MQL) were 2,1-32,6 ng.g⁻¹ and 6,9-108,6 ng.g⁻¹, respectively. In addition, the matrix effect ranged from 85-118% whereas the overall recovery was dropped into the range of 90,58-102,56%, and RSD was in 0,44-15,25%. The data indicated that the innovation method was simple, accurate, and efficient for the analysis of auxin and gibberellin in vegetable tissues. It could be further studied to develop and apply this method in analyzing plant growth regulators in fruits and agricultural products.

Keywords: auxin, gibberellin, plant growth regulator, vegetable.

1. MỞ ĐẦU

Chất kích thích sinh trưởng thực vật được xem là một trong những giải pháp tốt trong nông nghiệp để thúc đẩy nhanh quá trình tăng trưởng của cây. Trong tự nhiên, các chất kích thích sinh trưởng thực vật còn được gọi là các hoocmon sinh trưởng thực vật, là những chất được sinh ra trong cây. Bằng con đường hóa học nhân tạo, nhiều hợp chất khác nhau, có hoạt tính tương tự với các chất kích thích sinh trưởng thực vật tự nhiên được tổng hợp nhân tạo và dùng để điều chỉnh quá trình sinh trưởng, phát triển của cây nhằm tăng năng suất và phẩm chất của cây trồng.

Việc sử dụng các chất kích thích sinh trưởng thực vật trong sản xuất nông nghiệp cũng diễn ra khá phổ biến ở Việt Nam, tuy nhiên, rất ít công trình công bố nghiên cứu về phương pháp phân tích và đánh giá dư lượng của các chất này trong các sản phẩm nông nghiệp, đặc biệt là rau xanh. Mặt khác, có nhiều loại thuốc kích

thích sinh trưởng thực vật không có nhãn mác và nguồn gốc xuất xứ vẫn được nông dân truyền tai nhau sử dụng do hiệu quả nhanh chóng và vượt trội của chúng mang lại cho cây trồng. Đây là một trong những nguyên nhân tiềm ẩn có thể gây nên tình trạng ngộ độc thực phẩm và ô nhiễm môi trường liên quan đến dư lượng của các hóa chất sử dụng trong sản xuất nông nghiệp. Do đó, việc nghiên cứu và xây dựng quy trình phân tích các chất kích thích sinh trưởng thực vật đóng vai trò quan trọng trong việc đánh giá dư lượng và thực trạng sử dụng chúng trong sản xuất nông nghiệp.

Tuy nhiên, trong tự nhiên hàm lượng các chất kích thích sinh trưởng thực vật có nồng độ rất thấp (10^{-9} đến 10^{-6} M), do đó, việc phát triển một phương pháp phân tích định lượng các chất này là một thách thức lớn đối với các nhà khoa học (Maren và Sergi, 2011; Izumi et al., 2009). Bên cạnh đó, các chất kích thích sinh trưởng có tính chất hóa học và cấu trúc đa dạng,

khuyến cho việc định lượng đồng thời trở nên khó khăn (Yu et al., 2012). Một số phương pháp phân tích các phytohormone đã được nghiên cứu như: bioassay, xét nghiệm miễn dịch, sắc ký khí khối phổ (GC-MS)... Tuy nhiên, hạn chế của các phương pháp này là việc chuẩn bị mẫu phức tạp, trong khi đó độ đặc hiệu và độ lặp lại thấp, và nhiều chất bị phân hủy ở nhiệt độ cao (GC)... do đó, nên làm giới hạn phạm vi ứng dụng của chúng trong phân tích các chất kích thích sinh trưởng thực vật (Weiler, 1984; Sandberg et al., 1987; Meyer et al., 2003; Del và Blanch, 2007).

Thiết bị HPLC có hiệu quả thấp đối với việc định lượng các hoocmon thực vật ở hàm lượng nano, nguyên nhân có thể do quá trình tinh chế mẫu phức tạp (Pan et al., 2010; Qingfeng et al., 2014). Sự kết hợp của HPLC với đầu dò khối phổ giúp cải thiện độ nhạy và độ chọn lọc, cũng như cho phép xác định và định lượng đồng thời nhiều hợp chất trong một thí nghiệm (Ljung và cộng sự, 2004; Qingfeng et al., 2014; Matías et al., 2015). Tuy nhiên, tùy vào điều kiện của các phòng thí nghiệm mà có thể sử dụng các đầu dò khối phổ khác nhau như: đầu dò ba tứ cực (TQ), bẫy ion, tứ cực thời gian bay (Q-TOF) và Orbitrap.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi thực hiện xây dựng và phát triển phương pháp phân tích đồng thời các hợp chất auxin và gibberellin trong rau sử dụng thiết bị sắc ký lỏng ghép nối với đầu dò khối phổ bẫy ion.

2. THÍ NGHIỆM

2.1. Hóa chất thí nghiệm

Các chất chuẩn có độ tinh khiết $\geq 98\%$ gồm: IAA, IBA, ICA, IPA, GA₃, GA₄, GA₇ được mua từ công ty OlChemim Ltd., Cộng hòa Czech. MeOH và ACN ($\geq 99,80\%$), được mua của Merck, Đức. Foocmic acid, FA và HCl 65% của Merck, Đức. Dung môi dichloromethane, 1-propanol và 2-propanol mua của Sigma-Aldrich (Singapore).

2.2. Điều kiện phân tích HPLC

- Thiết bị Ultimate 3000 UPLC (Thermo Fisher Scientific, Germany),
- Cột sắc ký Hypersil GOLD aQ: 150 x 2.1 mm, 3 μ m.

- Pha động: DI (Chứa 0,1% FA) và MeOH (chứa 0,1% FA)
- Tốc độ dòng: 0,1 mL/min
- Nhiệt độ cột tách: 40°C.
- Gradient: 15 phút với tỷ lệ dung môi methanol biến đổi từ 30-90%.

2.3. Điều kiện khối phổ

Sử dụng thiết bị phân tích khối phổ LCQ Fleet MS (Thermo Fisher Scientific, Germany) với nguồn ion hóa điện hóa (ESI).

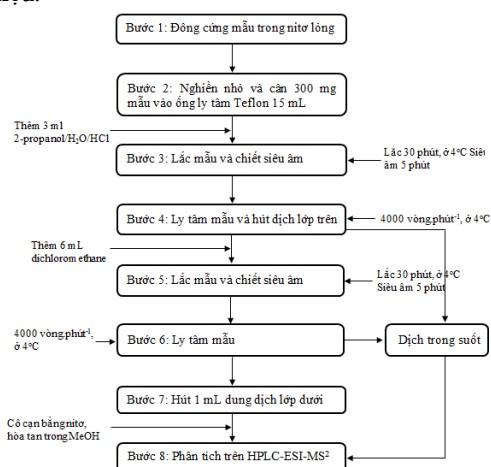
Bơm trực tiếp dung dịch chuẩn 1 ng. μ L⁻¹ của các chất phân tích vào detector MS sử dụng kim bơm Hamilton (500 μ L, Hoa Kỳ) ở tốc độ dòng 5 μ L.min⁻¹.

Điều kiện phân tích khối phổ: được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Điều kiện phân tích khối phổ

TT	Thông số	Đơn vị	Giá trị tối ưu
1	Nhiệt độ nguồn	°C	100
2	Tốc độ dòng khí mang	L/phút	25
3	Tốc độ dòng khí bỏ trợ	L/phút	5
4	Tốc độ dòng khí quét buồng ion hóa	L/phút	0
5	Điện thế nguồn phun		
	- Ion âm	kV	-3,0
	- Ion dương	kV	3,6
6	Nhiệt độ ống mao quản	°C	200
7	Điện thế ống mao quản		
	- Ion âm	V	-31
	- Ion dương	V	4
8	Điện thế thấu kính hội tụ:		
	- Ion âm	V	-125
	- Ion dương	V	70

Phần mềm Xcallibur (Version 2.2, Thermo Fisher Scientific) được sử dụng để xử lý dữ liệu.



Hình 1. Quy trình xử lý và phân tích các chất auxin và gibberellin trong rau

2.4. Xây dựng đường chuẩn và xác minh phương pháp

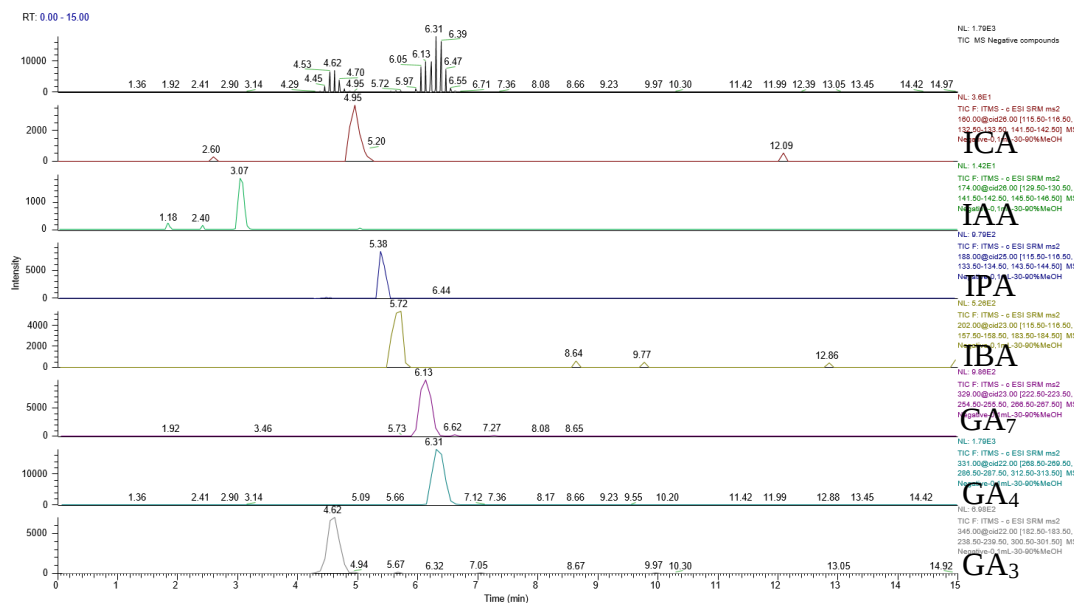
Xây dựng đường chuẩn gồm các điểm có nồng độ: 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1,000 và 2,000 ng.mL⁻¹.

Xác định các giá trị giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp phân tích theo công thức: MDL = 3 × S/N và MQL = 10 × S/N [EMA, 2012].

Ảnh hưởng của nền mẫu:

$$ME (\%) = S_{MT}/S_C \times 100$$

Trong đó: S_{MT} và S_{MC} lần lượt là diện tích pic của chất cần phân tích trong mẫu trắng thêm chuẩn sau chiết và trong mẫu chuẩn dung môi.



Hình 2. Sắc ký đồ của các chất kích thích sinh trưởng auxin và gibberellin

Các chất kích thích sinh trưởng thực vật thuộc nhóm auxin (IAA, IBA, ICA, IPA) và nhóm gibberellin (GA₃, GA₄, và GA₇) được phân tích theo chế độ ion hóa âm. Trong đó, IAA rửa giải đầu tiên tại 3,07 phút, tiếp đó là GA₃ tại 4,62 phút. Năm hợp chất kích thích sinh trưởng còn lại bao gồm ICA, IPA, IBA, GA₇ và GA₄ được xác định lần lượt theo thứ tự ở các thời gian lưu khác nhau, gồm: 4,96 phút; 5,38 phút; 5,72 phút; 6,13 phút và 6,31 phút.

3.2. Đường chuẩn, giới hạn phát hiện (MDL) và giới hạn định lượng (MQL)

Xác định độ thu hồi của phương pháp ở 3 mức thêm chuẩn khác nhau gồm: 10 ng.mL⁻¹ (mức thấp), 100 ng.mL⁻¹ (mức trung bình) và 1.000 ng.mL⁻¹ (mức cao). Công thức tính:

$$R (\%) = S_{TC}/S_C \times 100\%$$

Trong đó: S_{TC} và S_C lần lượt là diện tích pic của chất cần phân tích trong mẫu thêm chuẩn/chiết và mẫu chiết/thêm chuẩn.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân tích các chất auxin và gibberellin

Các giá trị đường chuẩn, MDL, MQL của các hợp chất auxin và gibberellin được trình bày ở Bảng 2. Hệ số tương quan (R^2) cao nhất thu được là 0,9997 khi phân tích 2 hợp chất kích thích sinh trưởng IAA và GA₃, tiếp theo là 0,9993 khi phân tích hợp chất GA₄. Các hợp chất auxin có giá trị R^2 nằm trong khoảng 0,9985-0,9997 và giá trị thấp nhất thu được ở hợp chất GA₇ ($R^2 = 0,9961$). Nhìn chung, các hệ số tương quan của các hợp chất kích thích sinh trưởng đều cao hơn giá trị 0.99 và do đó được coi là chấp nhận được.

Bảng 2. Đường chuẩn, MDL và MQL của các chất phân tích

Chất	Đường chuẩn	R ²	MDL (ng.g ⁻¹)	MQL (ng.g ⁻¹)
IAA	y = 0,19x + 1,99	0,9997	32,6	108,6
IBA	y = 2,46x + 20,60	0,9987	3,2	10,8
ICA	y = 4,45x + 127,66	0,9985	2,1	6,9
IPA	y = 0,44x - 1,39	0,9992	14,3	47,6
GA ₃	y = 1,46x + 14,33	0,9997	5,2	17,2
GA ₄	y = 4,44x + 144,25	0,9993	4,1	13,8
GA ₇	y = 2,12x + 95,66	0,9961	4,3	10,8

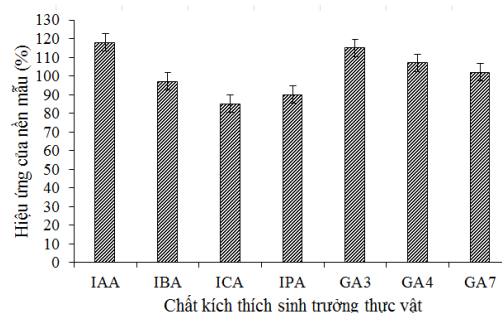
Các hợp chất kích thích sinh trưởng thực vật khác nhau có giá trị MDL và MQL khác nhau. Bảng 2 cho thấy, MDL thấp nhất được phát hiện ở hợp chất ICA (2,1 ng.g⁻¹), tiếp đến là IBA (3,2 ng.g⁻¹), sau đó là các hợp chất gibberellin (4,1 -5,3 ng.g⁻¹), IPA (14,3 ng.g⁻¹), và cao nhất là IAA (32,6 ng.g⁻¹). Giá trị MQL tương ứng của các chất phân tích dao động trong khoảng từ 6,9-108,6 (ng.g⁻¹). Kết quả nghiên cứu này phản ánh được tính phù hợp của phương pháp phân tích này trong vấn đề định tính và định lượng các hợp chất kích thích sinh trưởng trong mẫu rau.

3.3. Ảnh hưởng của nền mẫu

Hiệu ứng nền mẫu là yếu tố quan trọng hàng đầu ảnh hưởng đến độ lặp lại của phương pháp phân tích sắc ký lỏng ghép nối với khối phổ. Hiệu ứng nền mẫu được đánh giá thông qua việc so sánh diện tích pic của các chất kích thích sinh trưởng thực vật trong các mẫu trắng thêm chuẩn sau chiết với diện tích pic của chất phân tích trong dung môi ở cùng nồng độ nhất định. Một số nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng, giá trị ME = 100% có nghĩa là không có sự ảnh hưởng của nền mẫu đến hệ thống phân tích khối phổ; còn giá trị ME cao hơn hoặc thấp hơn 100% tương ứng với hiệu ứng tăng cường hoặc ức chế sự ion hóa. Khoảng giá trị ME dao động từ 80-120% được xem là khoảng chấp nhận được và nền mẫu có ảnh hưởng không đáng kể đến kết quả phân tích và ngược lại, các giá trị ME nằm ngoài khoảng giới hạn

này biểu thị sự ảnh hưởng của hiệu ứng nền mẫu đến kết quả phân tích trên thiết bị phân tích MS (Báo cáo, 2014; Kowalczyk, và G. Sandberg, 2001).

Sự ảnh hưởng của nền mẫu rau cải xanh đến tín hiệu của các chất kích thích sinh trưởng thực vật được biểu thị ở Hình 2. Giá trị ME cao nhất là 118% được phát hiện ở hợp chất IAA và thấp nhất là 85% ở hợp chất ICA. Đặc biệt, các hợp chất thuộc nhóm gibberellin có giá trị ME > 100%, trong đó, ME của GA₃ là 115%, GA₄ là 107% và GA₇ là 102%. Giá trị ME của hai hợp chất còn lại là IBA và IPA lần lượt là 97% và 90%. Điều này cho thấy rằng, nền mẫu ảnh hưởng không đáng kể đến kết quả phân tích các chất phân tích trong các mẫu rau cải xanh.



3.3. Hiệu suất thu hồi của quá trình tách chiết

Có sự khác nhau về hiệu suất thu hồi trung bình giữa các nồng độ khác nhau của mỗi hợp chất kích thích sinh trưởng thực vật và giữa các hợp chất có cùng nồng độ đánh giá. Hiệu suất thu hồi trung bình của các chất dao động từ 86,09 -103,73%. Trong đó, ở mức nồng độ thấp, các chất có nồng độ thay đổi từ 68,42% đến 119,47%, đối với mức nồng độ trung bình là 90,86-101,87% và mức nồng độ cao là 92,58-102,56%. Giá trị RSD của các chất nằm trong khoảng 0,44-15,25%. Theo SANTE/11813/2017, hiệu suất thu hồi trung bình nằm trong phạm vi 70 đến 120%, với RSD ≤ 20% được xem là chấp nhận được và đảm bảo yêu cầu của phương pháp phân tích. Kết quả nghiên cứu này cho thấy quy trình tách chiết nghiên cứu phù hợp với việc phân tích các hợp chất auxin và gibberellin trong các mẫu rau.

4. KẾT LUẬN

Quy trình phân tích đồng thời các hợp chất auxin và gibberellin trong mẫu rau xanh được xây dựng có hệ số $R^2 > 0,996$, giới hạn phát hiện nằm trong khoảng 2,1-32,6 ng.g⁻¹, giới hạn định lượng 6,9-108,6 ng.g⁻¹. Hiệu ứng của nền mẫu nằm trong khoảng 85-118%, hiệu suất thu hồi của phương pháp đạt 90,58-102,56%, RSD 0,44-15,25%. Kết quả này cho thấy, quy

trình nghiên cứu đáp ứng yêu cầu của một phương pháp phân tích, là cơ sở để nghiên cứu và phát triển phương pháp phân tích các chất kích thích sinh trưởng thực vật trong rau xanh, trái cây và các sản phẩm nông nghiệp khác.

CẢM ƠN:

Nghiên cứu này được hỗ trợ thực hiện bởi các nhiệm vụ khoa học công nghệ có mã số: TDNDTP.01/19-21 và QTHU01.01/20-21.

Bảng 2. Độ lặp lại và độ thu hồi của các hợp chất auxin và gibberellin

Hợp chất	Nồng độ pha (µg.mL ⁻¹)	Độ lặp lại (RSD, %)	Độ thu hồi* (%)	Độ thu hồi TB (%)*
IAA	10	8,00	104,17	103,73 ± 4,20
	100	10,79	107,69	
	1000	4,60	99,33	
IBA	10	6,19	92,31	93,32 ± 3,10
	100	10,71	90,86	
	1000	3,74	96,80	
ICA	10	2,99	85,71	92,49 ± 5,92
	100	0,61	96,68	
	1000	3,13	95,07	
IPA	10	15,25	68,42	86,09 ± 15,34
	100	3,72	93,84	
	1000	0,48	96,02	
GA ₃	10	11,07	119,47	104,50 ± 13,42
	100	5,52	101,87	
	1000	3,68	92,58	
GA ₄	10	1,92	105,35	101,60 ± 4,31
	100	1,42	96,90	
	1000	0,63	102,56	
GA ₇	10	4,54	108,60	102,35 ± 5,80
	100	0,44	97,14	
	1000	1,13	101,31	

(*) Biểu thị giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn, n = 6

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed, 2017, Supersedes Document No. SANTE/11945/2015. Implemented by 01/01/2018.
2. Báo cáo Tổng kết – Chương trình thử nghiệm thành thạo so sánh Liên phòng thí nghiệm – Viện Kiểm nghiệm thuốc Thành phố HCM, 2014.

3. Del C. M. L. R, Blanch G. P. Enantiomeric purity of (±)-methyl jasmonate in fresh leaf samples and commercial fragrances. *J. Sep. Sci.* 2007, 30, 2117–2122.
4. EMA, Bioanalytical method validation, European Medicines Agency, 2012. Available: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation>. [Accessed: 08-Dec-2019].
5. Izumi Y., Okazawa A., Bamba T., Kobayashi A., Fukusaki E. Development of a method for comprehensive and quantitative

analysis of plant hormones by highly sensitive nanoflow liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*. 2009, 648 (2), 215-225.

6. Ljung, K., Sandberg, G., Moritz, T. Hormone analysis. In: Davies, P. (Ed.), *Plant horm. Biosynthesis, Signal Transduct. Action!* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL., 2004, 671-694.

7. M. Kowalczyk, and G. Sandberg, Quantitative analysis of indole-3- acetic acid metabolites in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 2001, 127, 1845-1853.

8. Maren M. and Sergi M. B. Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Plant. Methods*. 2011, 7:37.

9. Marília A. T., Gezimar D. D. S., Edson R. F., William B. and Axel M. Validate method for phytohormone quantification in plants. *Front. Plant. Sci*. 2014, 5, Article 417.

10. Matías M., Aurelio G. C., Vicent A. Rapid and reproducible determination of active gibberelins in citrus tissues by UPLC/ESI-MS/MS. *Plant. Physiol. Biochem*. 2015, 94, 1-9.

11. Meyer R., Rautenbach G.F., Dubery I.A. Identification and quantification of methyl jasmonate in leaf volatiles of *Arabidopsis thaliana* using solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and

mass spectrometry. *Phytochem. Anal*. 2003, 14, 155-159.

12. Qingfeng N., Yu Z., Minjie Q., Fengxia Y. and Yuanwen T. Simultaneous quantitative determination of major plant hormones in pear flowers and fruit by UPLC/ESI-MS/MS. *Anal. Methods*. 2014, 6(6),1766.

13. Sandberg G., Crozier A. and Ernstsén A. Indole-3-acetic acid and related compounds. In: Rivier L. and Crozier A. (Ed.), *Principles and practice of plant hormone analysis*, Academic Press, London, 1987, pp 233.

14. Volksch, B., Bublitz F., and Fritsche W. Coronatine production by *Pseudomonas syringae* pathovars: screening method and capacity of product formation. *J. Basic. Microbiol*. 1989, 29, 463-468.

15. Weiler, E.W. Immunoassay of plant growth regulators. *Annu. Rev. Plant. Physiol*. 1984, 35, 85-95.

16. Yu B., Fuyou D., Yu B. and Huwei L. Determination strategies of phytohormones: recent advances. *Anal. Methods*. 2012, 2(12), 1867-1873.

17. Zhao Y. C., Li H. S., Ren X. M., Lin P. Z., Xiao Y. L., Zhi W. Z., Ming X. C. Profiling of phytohormones and their major metabolites in rice using binary solid-phase extraction and liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. 2016, 1451, 67-74.