

## QUY TRÌNH PHÂN TÍCH SÀNG LỌC MỘT SỐ CHẤT KÍCH THÍCH TĂNG TRƯỞNG THỰC VẬT TRONG RAU XANH

Đến tòa soạn 10-4-2019

Le Van Nhan, Nguyen Quang Trung, Hoang Thi Thoa, Nguyen Ngoc Tung

Center for Research and Technology Transfer,

Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi, Vietnam

Quach Thi Son

Son La College, Son La, Vietnam

### SUMMARY

#### PROCESSING OF EXTRACTION AND ANALYSIS OF PLANT GROWTH SUBSTANCES IN VEGETABLES

*This method was applied to extract and analyze some kinds of phytohormones in vegetables. Plant tissues washed by tap water before frozen in liquid nitrogen and kept under 4°C in the freeze until to be analyzed. After grinding into powder, plant hormones in the samples were extracted by 2-propanol/H<sub>2</sub>O/concentrated HCl (2:1:0.002, vol/vol/vol) and Dichloromethane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), respectively. The supernatant was concentrated by nitrogen flow during an hour and dissolved in MeOH and then directly injected into column and analyzed by HPLC-ESI-MS/MS. 9 plant hormones had been identified and quantified in the plant tissues, with the limit of detection (LOD) was ranged from 0.19 ng.g<sup>-1</sup> to 22.14 ng.g<sup>-1</sup> and an acceptable relatively higher recovery rate from 62.24-91.35%. To our knowledge, this is a rapid, simple, sensitive, accurate and efficient method for the analysis of phytohormones in vegetable samples using HPLC-ESI-MS/MS.*

**Keywords:** plant hormone, gibberelin, auxin, cytokinin, HPLC-ESI-MS/MS

### 1. GIỚI THIỆU

Chất kích thích tăng trưởng thực vật (plant hormone) đóng vai trò quan trọng trong hầu hết các quá trình sinh lý trong chu kỳ sống của thực vật, như sự tăng trưởng, sự trao đổi chất và sự hình thành từ sự nảy mầm đến sự lão hóa. Trên cơ sở cấu trúc và chức năng sinh lý của chúng, các hormone thực vật được phân thành một số nhóm chính bao gồm axit abscisic (ABAs), auxin, cytokinin, gibberellin và ethylene, và các phytohormone khác như jasmonate, salicylat (Zhao-Yun và cộng sự, 2016). Việc xác định và định lượng phytohormone trong thực vật thu hút sự quan tâm và cần thiết của các nhà nghiên cứu về

sinh học và sinh lý thực vật để tìm hiểu chức năng của chúng trong chuyển hóa thực vật và tương tác sinh thái (Marília et al. 2014, Matías et al. 2015).

Theo Maren và cộng sự (2011) và Izumi và ctv (2009), sự hiện diện của các hormone ở nồng độ rất thấp trong các mô thực vật (10<sup>-9</sup> đến 10<sup>-6</sup> M), do đó, việc phát triển phương pháp phân tích, xác định chất kích thích tăng trưởng là một thách thức. Ngoài ra, một thách thức khác là các hormone khác nhau có các tính chất hóa học và cấu trúc đa dạng, khiến cho việc đánh giá đồng thời và công bằng về số lượng của chúng trở nên khó khăn (Yun et al. 2010). Một số các phương pháp xác định và định lượng chất kích thích tăng trưởng đã được báo

cáo. Bioassays được coi là một phương pháp cổ điển để phân tích hormone và lần đầu tiên được sử dụng trong việc xác định các chất hỗ trợ vào năm 1928 (Volksch et al. 1989). Tuy nhiên, phương pháp này thiếu sự hấp dẫn trong việc chuẩn bị mẫu, độ đặc hiệu thấp và độ lặp lại kém, do đó việc áp dụng Bioassays ít thu hút được sự chú ý trong những năm gần đây (Yun et al. 2010). Sau đó, xét nghiệm miễn dịch (immunoassays) đã được sử dụng như là phương pháp có độ nhạy cao đầu tiên trong việc định lượng các hooc môn thực vật (Weiler, 1984; Sandberg et al. 1987). Tuy nhiên, sự xuất hiện của các phản ứng chéo và thời gian chuẩn bị kháng thể dài làm hạn chế các ứng dụng tiếp theo của chúng. Hơn nữa, kháng thể đặc hiệu không phù hợp để phát hiện đồng thời nhiều loại hormone thực vật khác nhau. Trong các nghiên cứu trước đây, sắc ký khí - phép đo phổ khối (GC-MS) là một kỹ thuật được công nhận trong lĩnh vực phân tích phytohormone (Meyer et al. 2003, Del et al. 2007, Pan et al. 2010). GC-MS được công nhận là một phương pháp hiệu quả nhận dạng cấu trúc và định lượng chính xác trong phân tích các hooc môn thực vật, nhưng yêu cầu của mẫu phải bay hơi làm hạn chế các ứng dụng của nó đối với tất cả các loại hooc mon thực vật. Hơn nữa, một số thành phần không bền với nhiệt thường bị phân hủy ở nhiệt độ cao trong injector và cột của máy GC – nguyên nhân làm hạn chế sử dụng GC trong phân tích hooc môn tăng trưởng. Theo Qingfeng và ctv (2014), HPLC với phát hiện điện hóa kém hiệu quả trong việc phân tích định lượng các hooc môn thực vật trong các mẫu ở mức độ hàm lượng nano bởi vì quá trình lọc phức tạp và giới hạn định lượng đáp ứng để đáp ứng yêu cầu xác định khá cao và khó thành công với các mẫu có hàm lượng thấp. Trong những năm gần đây, các máy phân tích khối phổ kết nối với hệ thống sắc ký lỏng khá phát triển và được triển khai trong phân tích hóa lý cho phép gia tăng độ nhạy và độ chọn lọc, có thể xác định và định lượng đồng thời nhiều hợp chất trong một lần chạy (Ljung et al. 2004, Hou et al. 2008, Matías et al. 2015). Tuy nhiên, cách tiếp cận có thể khác nhau tùy thuộc vào phương pháp tách sử dụng sắc ký lỏng và

các dạng khối phổ như 3 tứ cực, iontrap, orbitrap, TOF... ứng dụng trong định lượng. Do đó, phát triển một phương pháp phân tích nhanh, nhạy, đơn giản, chính xác và hiệu quả để phân tích các chất kích thích tăng trưởng trong các mẫu sinh học phức tạp là thực sự cần thiết và có ý nghĩa trong nghiên cứu thực vật.

## 2. THỰC NGHIỆM

### 2.1. Hóa chất

Các chất chuẩn: Indole-3-butyric acid, Indole-3-carboxylic acid, Trans-zeatin, N6-Benzyladenine, Kinetin, N6-Isopentenyladenine, Gibbereline A<sub>3</sub>, Gibbereline A<sub>4</sub> and Gibbereline A<sub>7</sub> được mua từ Công ty OlChemim Ltd. (Olomouc, Czech Republic).

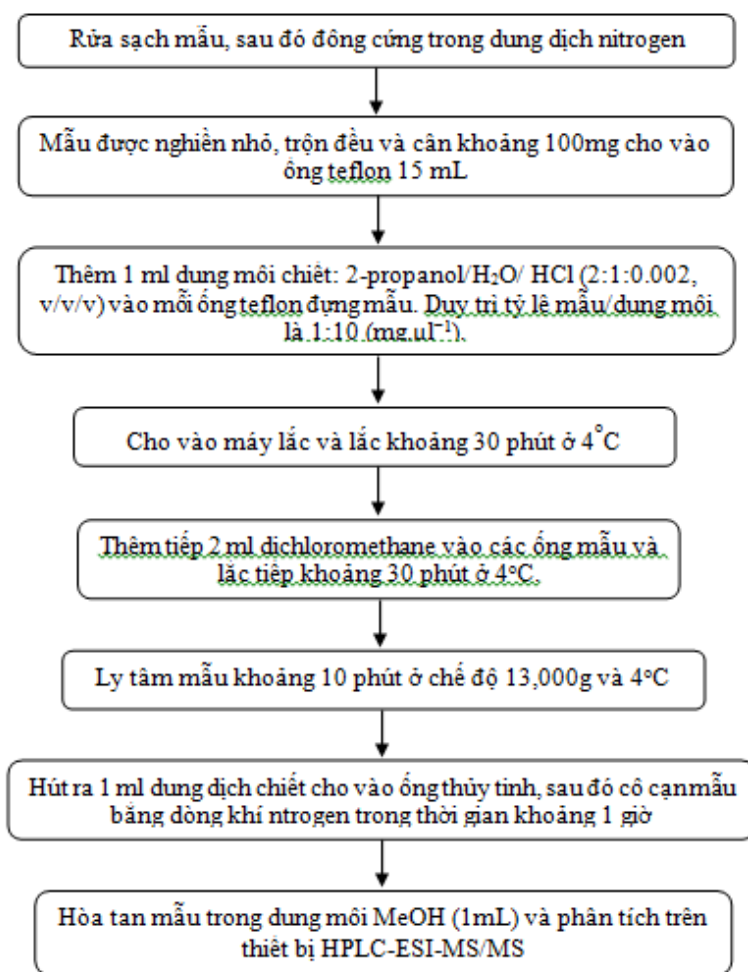
Methanol (MeOH) dùng cho HPLC có độ tinh khiết 99.80% và formic acid (FA) là các sản phẩm của Công ty Sigma Aldrich (Singapore) trong khi đó nước deion được tạo ra bằng máy Milli-Q Integral 3 (Merck Millipore, France).

### 2.2. Quy trình tách và chiết mẫu

Quy trình tách và chiết mẫu rau để phân tích các chất kích thích tăng trưởng được trình bày ở Hình 1.

### 2.3. Điều kiện HPLC

- Thiết bị Ultimate 30000 HPLC system (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany),
- Cột sắc ký: Hypersil GOLD aQ with DIM 150 x 2.1 mm, Particle size: 3 μm
- Pha động A: nước deion (chứa 0.1% axit formic)
- Pha động B: MeOH (chứa 0.1% axit formic)
- Tốc độ dòng: 0,1 mL/min
- khay đựng mẫu được duy trì ở 8°C và cột tách được kiểm soát ở điều kiện 30°C.
- Các chất kích thích tăng trưởng được tách bằng cột sắc ký và rửa giải bằng các pha động ở trên theo chế độ thay đổi dòng trong thời gian 15 phút như sau: khoảng 3 phút ban đầu tỷ lệ dung môi methanol chiếm 30%, sau đó được tăng dần trong thời gian 6 phút tới tỷ lệ nồng độ 90% và duy trì ở tỷ lệ này trong khoảng 3 phút; tiếp đó tỷ lệ methanol giảm xuống 30% trong thời gian 1 phút và duy trì khoảng 2 phút trước khi chuyển sang phân tích các mẫu tiếp theo.



Hình 1. Quy trình tách và chiết các chất kích thích tăng trưởng trong rau

#### 2.4. Điều kiện khối phổ:

Việc định lượng và xác định các chất kích thích tăng trưởng và các chất chuyển hóa chính của chúng được thực hiện trên thiết bị phân tích khối phổ LCQ Fleet MS (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) được trang bị nguồn ion hóa điện hóa (ESI). Dung dịch chuẩn của các hormone tăng trưởng được chuẩn bị trong hỗn hợp MeOH/ H<sub>2</sub>O/FA (50/50/0.1%, v/v/v). Hỗn hợp chuẩn (1 ng.µL<sup>-1</sup>) của các chất kích thích tăng trưởng được bơm trực tiếp vào detector MS thông qua syringe Hamilton (500 µL, USA) ở tốc độ dòng µL.min<sup>-1</sup>.

Các điều kiện phân tích khối phổ được tối ưu hóa và thiết lập bao gồm: heater temperature 100°C, Sheath gas flow rate 25 (arb), Auxiliary

gas flow rate 5 (arb), sweep gas flow rate 0 (arb), spray voltage 3.6 (kV), Capillary temperature 200°C, Capillary voltage -11 (V) and tube lens -55.98 (V).

Các dữ liệu phân tích, xử lý và đánh giá trên thiết bị khối phổ MS được thực hiện bởi phần mềm Xcallibur (Version 2.2, Thermo Fisher Scientific).

### 3. KẾT QUẢ

#### 3.1. Kết quả tối ưu các điều kiện phân tích

Các chất kích thích tăng trưởng Gibberelin A<sub>3</sub> (GA<sub>3</sub>), Gibberelin A<sub>4</sub> (GA<sub>4</sub>), Gibberelin A<sub>7</sub> (GA<sub>7</sub>), Indole-3-butyric acid (IBA) và Indole-3-carboxylic acid (ICA) được phân tích theo chế độ [M-H]<sup>-</sup> ions; trong khi các ion như Trans-zeatin (tZ), N<sup>6</sup>-Benzyladenine (BA), Kinetin (K) và N<sup>6</sup>-Isopentenyladenine (iP)

được phân tích theo chế độ  $[M+H]^+$  ions bằng cách sử dụng thiết bị ESI-MS/MS. Tiền ion và các ion sản phẩm của mỗi chất kích thích tăng trưởng được xác định thông qua các hợp chất xác thực và sự chuyển hóa từ ion mẹ sang ion con được lựa chọn dựa trên cường độ tín hiệu của các chất phân tích. Mức độ năng lượng cô lập ion của các chất phân tích được tối ưu hóa để tạo ra tín hiệu tối đa (Bảng 1). Trong khoảng năng lượng từ 18 đến 24 (eV), tiền ion của mỗi chất kích thích tăng trưởng tạo ra nhiều ra nhiều mảnh ion sản phẩm, trong đó mảnh ion sản phẩm có tín hiệu cao nhất được lựa chọn để định lượng, hai mảnh ion có tín hiệu cao tiếp theo được sử dụng để xác nhận lại ion mẹ ban đầu. Tiền ion, các ion sản phẩm và mức năng lượng cô lập ion tối ưu của các chất kích thích tăng trưởng trong rau được trình bày ở Bảng 1

### 3.2. Phân tích và xác nhận các chất kích thích tăng trưởng trong rau

Thời gian lưu của các chất kích thích tăng trưởng Gibberelin A<sub>3</sub> (GA<sub>3</sub>), Gibberelin A<sub>4</sub> (GA<sub>4</sub>), Gibberelin A<sub>7</sub> (GA<sub>7</sub>), Indole-3-butyric acid (IBA) và Indole-3-carboxylic acid (ICA) phân tích theo chế độ  $[M-H]^-$  ions được thể hiện ở Hình 2, trong khi thời gian rửa giải của 4 hợp chất Trans-zeatin (tZ), N<sub>6</sub>-Benzyladenine (BA), Kinetin (K) và N<sub>6</sub>-Isopentenyladenine (iP) phân tích theo chế độ  $[M+H]^+$  ions được trình bày ở Hình 3.

Nhìn chung, tất cả các chất kích thích tăng trưởng phân tích theo cả hai chế độ ion âm và ion dương đều được rửa giải trước 10 phút. Cụ thể, có thể thấy từ Hình 2, trong các ion phân tích theo chế độ  $[M-H]^-$ , có GA<sub>3</sub> được rửa giải sớm nhất ở 4.63 phút, tiếp đến là ion ICA, ở 5.15 phút. BA và GA<sub>7</sub> lần lượt là các ion được rửa giải ở vị trí thứ 3 và thứ tư ở 6.01 phút và 6.83 phút. 7.10 phút được ghi nhận là thời gian lưu của GA<sub>4</sub>, đây là ion được rửa giải muộn nhất trong nhóm các chất được phân tích theo chế độ ion âm (Hình 2).

Các quá trình chuyển đổi tiền ion và các ion sản phẩm khác nhau dưới chế độ giám sát phản ứng chọn lọc (selected reaction monitoring - SRM) cho phép phát hiện chính xác từng hợp

chất trong hỗn hợp các chất kích thích tăng trưởng. Ngoài ra, việc theo dõi quá trình chuyển đổi ion từ tiền chất sang ion sản phẩm thường dẫn đến việc xác định một số peaks có chung một thời gian lưu của hợp chất phân tích mục tiêu (Hình 2, 3). Những dữ liệu này cho thấy rằng sự kết hợp của thời gian lưu trong sắc ký lỏng và sự chẩn đoán quá trình chuyển hóa từ tiền ion sang ion sản phẩm trong ESI-MS/MS là bắt buộc và cùng nhau. Đây được xem là điểm đặc hiệu thiết yếu của việc định lượng các chất kích thích tăng trưởng trong rau.

### 3.3. Giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng và hiệu suất thu hồi của phương pháp

Việc xác thực phương pháp được thực hiện bằng cách tính toán giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của quy trình. Đường chuẩn của các chất kích thích tăng trưởng bao gồm các điểm có nồng độ khác nhau: 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 and 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  phân tích lặp lại 3 lần và kết quả được trình bày ở Bảng 2. Hệ số tương quan ( $R^2$ ) của các đường chuẩn dao động trong khoảng 0.9982 đến 0.9996, trong đó GA<sub>3</sub>: 0.9984, GA<sub>4</sub>: 0.9993, GA<sub>7</sub>: 0.9991, IBA: 0.9985, ICA: 0.9982, tZ: 0.9996, BA: 0.9991, K: 0.9992 và iP: 0.9989 (Bảng 2).

Giới hạn phát hiện (LOD) là nồng độ thấp nhất của chất phân tích, có thể phân biệt với độ nhiễu trong các mẫu trắng và được định nghĩa là nồng độ có tỷ lệ tín hiệu/ độ nhiễu (S/N) là 3. Bảng 2 cho thấy, nhóm gibberelin (GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> và GA<sub>7</sub>) có giới hạn phát hiện cao nhất, dao động trong khoảng 5.18 tới 22.14  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ . Tiếp đến là nhóm auxins bao gồm IBA và ICA có LOD lần lượt là 5.37  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  và 2.60  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ . Đặc biệt, nồng độ chất phân tích thấp nhất được phát hiện ở mức 0.19  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ , 0.30  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ , 0.43  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  và 1.21  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  tương ứng với các cytokinin bao gồm BA, tZ, K và iP (Bảng 2). Giới hạn định lượng (LOQ) được định nghĩa là nồng độ chất phân tích thấp nhất có thể được định lượng chính xác, và có tỷ lệ S/N là 10. Điều đáng chú ý ở Bảng 2 đó là có sự khác nhau về giới hạn định lượng của các chất kích thích tăng trưởng được phân tích bởi thiết bị sắc ký lỏng ghép nối song song khối phổ ở chế

độ ion hóa điện hóa. Giới hạn định lượng thấp nhất được ghi nhận ở chất N6-Benzyladenine (BA) với khoảng 0.64 ng.g<sup>-1</sup>. Trans-zeatin (tZ) và Kinetin (K) lần lượt xếp thứ 2 và thứ 3 với LOQ tương ứng bằng 1.0 ng.g<sup>-1</sup> và 1.42 ng.g<sup>-1</sup>. Vị trí thứ tư và thứ năm lần lượt thuộc về N6-Isopentenyladenine (iP) và Indole-3-carboxylic acid (ICA), ở 4.04 ng.g<sup>-1</sup> và 8.65 ng.g<sup>-1</sup>. GA<sub>4</sub> và IBA chia sẻ cùng vị trí về giá trị LOQ ở mức xấp xỉ 17 ng.g<sup>-1</sup> trong khi giới hạn định lượng của GA<sub>3</sub> là 32.41 ng.g<sup>-1</sup>. Đặc biệt, GA<sub>7</sub> được định lượng ở nồng độ cao nhất, khoảng 73.78 ng.g<sup>-1</sup> (Bảng 2).

Điều này cho thấy rằng ở cùng điều kiện phân tích nhưng các chất kích thích tăng trưởng trong rau được phát hiện và định lượng ở các nồng độ khác nhau, trong đó giới hạn phát hiện và định lượng thấp nhất thuộc về các chất thuộc nhóm cytokinin, tiếp đến là auxin và cao nhất ở nhóm gibberelin.

Hiệu suất thu hồi là giá trị được xác định bằng tỷ số giữa hàm lượng của mỗi chất kích thích tăng trưởng hiển thị các mẫu spiked/tách chiết và tách chiết/spiked. Bảng 2 cho thấy có sự khác nhau về giá trị hiệu suất thu hồi của các chất kích thích tăng trưởng. Hầu hết các hợp chất như GA<sub>3</sub>, GA<sub>7</sub>, IBA, tZ, K và iP có hiệu suất thu hồi trung bình dao động trong khoảng 80-90%. Đặc biệt, hiệu suất thu hồi của BA đạt giá trị cao nhất ở 91.35%, trong khi đó hiệu suất thu hồi của GA<sub>4</sub> khá thấp (63.65%), và thấp nhất là 62.24% đối với hợp chất ICA. Mặt khác, độ lệch chuẩn về sự lặp lại trong việc xác định hiệu suất thu hồi của các chất kích thích tăng trưởng chỉ nằm trong khoảng 1.86-7.49%. Điều này cho thấy rằng tầm quan trọng của việc chuẩn bị đường chuẩn trong nền mẫu và sự xác thực của phương pháp phân tích các chất kích thích tăng trưởng trong rau.

#### 4. KẾT LUẬN

Phương pháp phân tích này thể hiện phương trình tuyến tính của 9 chất kích thích tăng trưởng với hệ số tương quan R<sup>2</sup> > 0.998, giới hạn xác định từ 0.19 ng.g<sup>-1</sup> đến 1.21 ng.g<sup>-1</sup> đối với các cytokinins (BA, tZ, K và iP), từ 2.60 ng.g<sup>-1</sup> đến 5.37 ng.g<sup>-1</sup> đối với các auxins (ICA và IBA), và từ 5.18 tới 22.14 ng.g<sup>-1</sup> đối với các

gibberelins (GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> và GA<sub>7</sub>). Hiệu suất thu hồi của phương pháp đối với các chất phân tích từ 62.24% tới 91.35%. Theo hiểu biết của chúng tôi, đây là phương pháp phân tích nhanh, nhạy, đơn giản, chính xác và hiệu quả trong việc phân tích các chất kích thích tăng trưởng trong các mẫu rau sử dụng thiết bị HPLC-ESI-MS/MS.

#### LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả thực hiện nghiên cứu này xin trân trọng cảm ơn Đề tài: *Nghiên cứu và đánh giá hiện trạng sử dụng các chất kích thích tăng trưởng thực vật (QTHU01.02/18-19)* và Đề tài: *Phát triển phương pháp Profiling cho một số đối tượng thực phẩm từ thực vật (TDNDTP.01/19-21)* đã hỗ trợ kinh phí cho việc thực hiện nghiên cứu này.

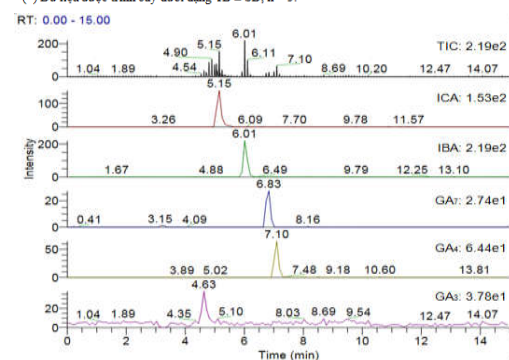
Bảng 1. Tiên ion, ion sản phẩm và năng lượng cơ của các chất kích thích tăng trưởng

Chất kích thích tăng trưởng	Chế độ phân tích	Thời gian lưu (Rt)	Tiền ion	Các ion sản phẩm		Năng lượng cơ lập (eV)
				Ion định lượng	Ion xác nhận	
GA <sub>3</sub>	-	4.63	345	239	143	19
GA <sub>4</sub>	-	7.10	331	313	283	20
					287	269
GA <sub>7</sub>	-	6.74	329	223	267	19
					311	116
IBA	-	6.01	202	134	116	20
ICA	-	5.06	160	116	158	18
					62	144
tZ	+	4.83	220	202	136	20
					148	148
BA	+	6.10	226	91	148	24
					209	188
K	+	5.31	216	148	173	22
					148	186
iP	+	6.44	204	136	148	20
					186	

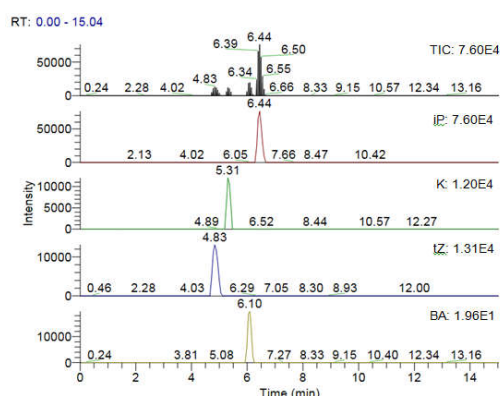
Bảng 2: giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng và hiệu suất thu hồi của các chất

Hợp chất	Đường chuẩn	R <sup>2</sup>	LOD (ng.g <sup>-1</sup> )	LOQ (ng.g <sup>-1</sup> )	Hiệu suất thu hồi (%)
GA <sub>3</sub>	y = 0.5191x + 0.4283	0.9984	9.72	32.41	82.36 ± 1.86
GA <sub>4</sub>	y = 1.0461x - 1.9908	0.9993	5.18	17.28	63.65 ± 5.40
GA <sub>7</sub>	y = 0.5469x - 3.6827	0.9991	22.14	73.78	85.72 ± 7.49
IBA	y = 4.2516x - 26.438	0.9985	5.37	17.89	84.23 ± 3.82
ICA	y = 3.3586x - 35.777	0.9982	2.60	8.65	62.24 ± 3.62
tZ	y = 420.36x + 423.86	0.9996	0.30	1.00	85.98 ± 6.10
BA	y = 409.42x - 3185.6	0.9991	0.19	0.64	91.35 ± 4.91
K	y = 258.42x - 1518.4	0.9992	0.43	1.42	90.25 ± 5.75
iP	y = 1528.8x - 4215.9	0.9989	1.21	4.04	89.43 ± 4.23

(\*) Dữ liệu được trình bày dưới dạng TB ± SD, n = 3.



Hình 2. Thời gian lưu của 5 chất kích thích tăng trưởng phân tích theo chế độ  $[M-H]^-$  ion



Hình 3. Thời gian lưu của 5 chất kích thích tăng trưởng phân tích theo chế độ  $[M+H]^+$  ion

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Del Castillo MLR, Blanch GP (2007) Enantiomeric purity of ( $\pm$ )-methyl jasmonate in fresh leaf samples and commercial fragrances. *J Sep Sci* 30:2117–2122.
2. G. Sandberg, A. Crozier and A. Ernstsén. Indole-3-acetic acid and related compounds. In: L. Rivier and A. Crozier (Ed.), Principles and practice of plant hormone analysis, Academic Press, London, pp, 233, 1987
3. Hou S, Zhu J, Ding M, Lv G. Simultaneous determination of gibberellic acid, indole-3-acetic acid and abscisic acid in wheat extracts by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Talanta*. 2008; 76(4):798-802.
4. 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 trap mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 2009, 648 (2): 215-25.
5. Ljung, K., Sandberg, G., Moritz, T. Hormone analysis. In: Davies, P. (Ed.), Plant horm. Biosynthesis, Signal Transduct. Action! Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL., pp. 671-694.
6. Maren Müller and Sergi Munné-Bosch. Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Plant Methods* 2011, 7:37.
7. Marília Almeida Trapp, Gezimar D. De Souza, Edson Rodrigues-Filho, William Boland and Axel Mithofer. Validate method for phytohormone quantification in plants. *Frontiers in Plant Science* 2014, Volume 5, Article 417.
8. Matías Manzi, Aurelio Gómez-Cadenas, Vicent Arbona. Rapid and reproducible determination of active gibberelins in citrus tissues by UPLC/ESI-MS/MS. *Plant Physiology and Biochemistry* 94 (2015), 1-9.
9. 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.
10. Ondrej Novak, Eva Hényková, Petra Amakorová, Miroslav Strnad. Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* 69 (2008) 2214–2224.
11. Pan XQ, Welti R, Wang XM. Quantitative analysis of major plant hormones in crude plant extracts by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Nat Protoc*. 2010; 5: 986–992.
12. Qingfeng Niu, Yu Zong, Minjie Qian, Fengxia Yang and Yuanwen Teng. Simultaneous quantitative determination of major plant hormones in pear flowers and fruit by UPLC/ESI-MS/MS. *Analytical methods* 2014, 6(6):1766.
13. Sheila D. S. Chiwocha, Suzanne R. Abrams, Stephen J. Ambrose, Adrian J. Cutler, Mary Loewen, Andrew R. S. Ross, Allison R. Kermode. A method for profiling classes of plant hormones and their metabolites using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry: an analysis of hormone regulation of thermodormancy of

lettuce (*Lactuca sativa L.*) seeds. The plant journal (2003), 35, 405-417.

14. Terezie Urbanová, Danuše Tarkowská, Ondřej Novák, Peter Hedden, Miroslav Strnad. Analysis of gibberellins as free acids by ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta* 112 (2013) 85–94

15. Terezie Urbanová, Danuše Tarkowská, Ondřej Novák, Peter Hedden, Miroslav Strnad. Analysis of gibberellins as free acids by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta* 112 (2013) 85–94.

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

17. Weiler, E. W. Immunoassay of plant growth regulators. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 35, 85-95. DOI: 10.1146/annurev.pp.35.060184.000505.

18. Xiangqing Pan, Ruth Welti and Xuemin Wang. Quantitative analysis of major plant hormones in crude plant extracts by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Nature Protocol* 2010, 5(6):986-92. DOI: 10.1038/nprot.2010.37.

19. Xiangqing Pan, Ruth Welti, Xuemin Wang. Simultaneous quantification of major phytohormones and related compounds in crude plant extracts by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* 69 (2008) 1773–1781.

---

## HÀM LƯỢNG THỦY NGÂN TRONG HÀU VÀ TRÀM TÍCH MẶT .....tiếp theo tr. 68

### 4.4. Kết luận

Sự tích lũy hàm lượng thủy ngân trong động vật nhuyễn thể hai mảnh vỏ thay đổi theo mùa (mùa mưa và mùa khô), cụ thể mùa khô phát hiện cao hơn mùa mưa. Tuy nhiên hàm lượng Hg trong nhiều mẫu nghiên cứu cao hơn so với quy chuẩn QCVN 8-2:2011/BYT [5] do đó cần phải có những cảnh báo sớm về hàm lượng kim loại nặng khi sử dụng làm thực phẩm chính hàng ngày.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đặng Thuý Bình, Nguyễn Thanh Sơn, Nguyễn Thị Thu Nga (2006). *Nghiên cứu sự tích lũy kim loại nặng trong ốc hương và một số đối tượng thủy sản (vẹm, hải sâm, rong sụn) tại đảo Điệp Sơn, Vịnh Vân Phong, Khánh Hòa*.

*Tap chí Khoa học – Công nghệ Thủy sản số 03-04/2006*. Nguyễn Thị Thu Nga (2006). “*Nghiên cứu sự tích lũy kim loại nặng trong ốc hương và một số đối tượng thủy sản (vẹm, hải sâm, rong sụn) tại đảo Điệp Sơn, Vịnh Vân Phong, Khánh Hòa*”. *Tap chí Khoa học – Công nghệ Thủy sản số 4*.

2. Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia QCVN 8-2:2011/BYT đối với giới hạn ô nhiễm kim loại nặng trong thực phẩm.

3. Codex and World Health Organization (WHO): *The Codex General Standard for Contaminants and Toxins in Food and Feed* (Code stand 193-1995).