

Phân tích hoạt chất kích thích sinh trưởng axit gibberillic trong rau xanh

Cao Thị Hường

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Khoa Hóa
Luận văn ThS Chuyên ngành : Hóa phân tích; Mã số: 60 44 29
Cán bộ hướng dẫn khoa học: PGS.TS Tạ Thị Thảo
Năm bảo vệ: 2011

Abstract: Tổng quan về chất kích thích sinh trưởng; axit gibberillic (GA3); phương pháp xác định axit gibberillic. Nghiên cứu phương pháp phân tích dư lượng axit Gibberillic rau trên máy quang phổ UV-VIS 1601. Xác định hàm lượng thuốc kích thích sinh trưởng sử dụng phổ biến trên rau. Đưa ra kết quả và thảo luận: nghiên cứu điều kiện tối ưu xác định GA3 theo phổ UV-VIS; đánh giá phương pháp (đường chuẩn, khảo sát điều kiện chiết gibberillic trong rau xanh, đánh giá độ chính xác của phương pháp); phân tích dư lượng GA3 trong mẫu rau.

Keywords: Hóa phân tích; Rau xanh; Chất kích thích sinh trưởng; Axit Gibberillic

Content

Hiện nay, vệ sinh an toàn thực phẩm đang là vấn đề đáng báo động với người dân và các cấp quản lý. Nhiều vụ việc như sử dụng những hoá chất cấm trong nuôi trồng, chế biến nông thủy sản, thực phẩm, sản phẩm kém chất lượng lưu hành trên thị trường đang gây ảnh hưởng xấu đến xuất khẩu và tiêu dùng, các vụ ngộ độc thực phẩm ngày càng gia tăng, trong đó có ngộ độc thuốc bảo vệ thực vật (BVTV), càng làm bùng lên sự lo âu của người tiêu dùng.

Một trong nhiều nguyên nhân gây ra thực trạng ô nhiễm hóa chất BVTV trong nông sản là chi phí phân tích cao, đầu tư thiết bị phân tích lớn, quá trình phân tích sử dụng nhiều dung môi hữu cơ độc hại, quy trình phân tích phức tạp... Vì vậy việc phát triển các phương pháp phân tích theo hướng thân thiện với môi trường, chi phí thấp, cách làm đơn giản là phương án cần chú trọng.

Trước tình trạng chạy theo lợi nhuận lạm dụng thuốc kích thích sinh trưởng trên rau tại các vùng sản xuất rau ở Hà Nội, Hà Tây nên việc điều tra thống kê, tiến hành khảo nghiệm loại thuốc kích thích sinh trưởng đang sử dụng là hết sức cần thiết để đảm bảo vệ sinh an toàn thực phẩm cho người tiêu dùng, để làm cơ sở cho công tác quản lý.

Trên cơ sở điều tra luận văn sẽ tập trung vào loại thuốc KTST dùng phổ biến nhất. Phương pháp phân tích được xây dựng theo hướng hóa học xanh sử dụng ít dung môi hữu cơ, dùng các chất vô cơ không độc hại, quy trình phân tích đơn giản.

Trong quá trình sinh trưởng và phát triển bình thường, cây trồng cần các chất cơ bản như nước, cacbon dioxit, chất khoáng, chất dinh dưỡng... Sự phát triển cây trồng còn phụ thuộc vào một số yếu tố bên ngoài (ánh sáng, nhiệt độ, độ ẩm ...) và yếu tố bên trong của cây (hoạt động của các phản ứng sinh hóa, trong đó có sự tham gia của một số hóa chất)[14].

Ở thực vật cũng như động vật, sự điều tiết quá trình chuyển hóa, sinh trưởng, phát triển... phụ thuộc vào những tín hiệu hóa học, gọi là các hormon (bắt nguồn từ tiếng Hy Lạp hormon là kích thích). Các hormon giữ một vị trí quan trọng trong việc điều tiết các quá trình sinh trưởng và phát triển của cây. Các chất điều tiết sinh trưởng thực vật chia thành hai nhóm : các chất kích thích sinh trưởng và các chất ức chế sinh trưởng. Sự cân bằng giữa hai nhóm này quyết định đến quá trình sinh trưởng phát triển của cây.

Axit gibberelic (GA3) là chất có nhiều ứng dụng nhất trong nhóm Giberellin. Hoạt chất được các nhà hóa học Nhật Bản phân lập và xác định cấu trúc từ những năm 30 của thế kỷ XX. Đây là chất có cấu trúc phân tử phức tạp, gồm các nhị vòng và 8 trung tâm không gian. Mỗi cấu trúc có hoạt tính sinh học riêng và tác động lên cây trồng theo những cách khác nhau. Tùy vào mục đích sử dụng, người ta có thể tạo ra những đồng phân có cấu trúc phù hợp được xác định. Về mức dư lượng cho phép (MRL – Maximum Residue Level) của Gibberellin trên rau là 0,001 ppm.[5]

Năm 1995, Cục Bảo vệ Môi trường Hoa Kỳ (nơi cấp phép cho các hóa chất được sử dụng trong nông nghiệp) đã xếp GA3 nằm ở nhóm chất độc nhóm II. EPA cho phép sử dụng GA3 ở Hoa Kỳ mà chưa có cảnh báo cụ thể về ảnh hưởng của nó đối với môi trường cũng như vật nuôi và sinh vật hoang dã (theo Environmental Protection Agency, 1995). Tổ chức WHO và một số nước khác cũng xếp GA3 vào nhóm độc II. Tại New Zealand cũng không áp dụng mức dư lượng tối đa cho phép (MRL) đối với GA3 mà chỉ cần điều kiện dùng <200 ha/năm. Tại Đài Loan, MRL của GA3 đối với rau là 5 mg/kg, Nhật Bản là 0,2mg/kg. Có thể nói GA3 tương đối an toàn cho người sử dụng rau quả

Tiến hành xác định GA3 bằng phương pháp trắc quang UV-VIS: Lấy 1ml mẫu phân tích cho vào bình định mức 10ml rồi thêm 1 ml etanol tuyệt đối. Định mức bằng HCl 3,75M thu được 10ml mẫu. Sau đó mang đi đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 254nm.

Dư lượng GA3 trong mẫu rau xử lý theo quy trình sau: Lấy 200gam rau được rửa sạch, thái nhỏ từ 1-2cm . Rồi mang đi xay nhuyễn với một ít nước, dung dịch thu được lọc và lấy dung dịch.

Lấy 10ml dung dịch thu được cho vào phễu chiết 100ml, thêm 5ml HCl 0,1M. Tiến hành chiết 2 lần với 20ml etylaxetat. Phần dịch chiết thu được, được cho thêm than hoạt tính (GCB), rồi mang đi quay li tâm gạn lấy dung dịch. Phần dịch thu được chuyển vào phễu chiết 100ml, tiếp tục được chiết với 20, 15 và 10ml dung dịch đệm photphat pH 7,4. Phần dịch chiết thu được, được chuyển vào bình định mức 50ml. Dùng dung dịch đệm photphat pH 7,4 định mức đến vạch mức, ta thu được 50ml mẫu.

Chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc nồng độ $8\mu\text{g/ml}$, tiến hành lấy chất theo thứ tự sau: lấy 1ml GA3 chuẩn có nồng độ $8\mu\text{g/ml}$ cho vào bình định mức 10ml, thêm 1ml etanol tuyệt đối. Sau đó định mức bằng HCl 3,75M đến vạch mức ta thu được 10ml mẫu thử. Đem đo dải phổ trong khoảng 200–400nm với dung dịch so sánh là mẫu trắng. Mẫu trắng được chuẩn bị bằng cách lấy 1ml etanol tuyệt đối vào bình định mức 10ml, sau đó dùng dung dịch HCl 3,75M để định mức đến vạch mức ta thu được 10ml mẫu trắng.

Dựa vào kết quả trên ta thu được 1 cực đại của GA3 trong khoảng 200-400nm tại bước sóng 254nm. Do đó, chọn bước sóng 254nm để đo GA3 trong các thí nghiệm còn lại.

Qua khảo sát ảnh hưởng của ba yếu tố:

+ Nồng độ HCl ở các mức: 3; 3,25; 3,75; 4 (M)

+ Thể tích etanol với các mức: 0, 0,5; 1,0; 1,5; 2 (ml)

+ Thể tích nước với các mức: 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2 (ml)

Ta thấy rằng cả ba yếu tố này đều ảnh hưởng đến độ hấp thụ quang. Và ta đã chọn được thể tích etanol là 1ml, nồng độ HCl là 3,75 và thể tích nước là 0ml để đo độ hấp thụ quang trong các mẫu sau này.

Tiến hành khảo sát sự phụ thuộc của độ hấp thụ quang vào nồng độ GA3 để lập đường chuẩn. Từ dung dịch chuẩn gốc (stock) pha dãy dung dịch chuẩn làm việc có nồng độ GA3 là: 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30 $\mu\text{g/ml}$.

Lấy 1ml dung dịch chuẩn vào bình định mức 10ml, thêm 1ml etanol, sau đó định mức bằng HCl 3,75M. Đem đo phổ trong khoảng 200-300nm. Tại mỗi nồng độ lặp lại 3 lần.

Kết quả phân tích cho thấy phương trình hồi quy là bậc nhất có dạng:

$$y = 0,00045 + 0,0331x$$

Trong đó: y là độ hấp thụ quang

x là nồng độ GA3 ($\mu\text{g/ml}$)

R2 là hệ số tương quan (= 0,999)

S = Sy là độ lệch chuẩn của phương trình (= 0,00401185)

Kết quả phân tích phương sai cho thấy giá trị Pvalue < 0,05 của hằng số a, b < 0,05 chứng tỏ nồng độ và độ hấp thụ quang có quan hệ tuyến tính. Trị số P trong kết quả đánh giá của phương trình hồi qui (chuẩn F) <0,05 cũng chứng tỏ phương trình trên chỉ sự sai khác giữa lý thuyết.

Để kiểm tra sai số hệ thống của phương pháp cần so sánh hằng số a của phương trình hồi quy với giá trị 0. Nếu a=0, phương trình trở thành $y=b \cdot x$.

Giá trị trung bình	Độ sai chuẩn	Độ lệch chuẩn	Phương sai mẫu	Tổng	%CV
0,0332	0,000134	0,000378	1,43.10 ⁻⁷	0,2656	1,14

Tra bảng $F(0,95; 5; 6) = 4,387 \Rightarrow F_{\text{tính}} < F(0,95; 5; 6)$ có nghĩa là sự sai khác giữa giá trị a và 0 không có ý nghĩa thống kê hay phương pháp không mắc sai số hệ thống.

Như vậy ta thu được phương trình đường chuẩn $y=0,00045+0,0331x$, với khoảng tuyến tính trong khoảng 2 – 30 $\mu\text{g/ml}$. Đồ thị thu được có hệ số tương quan $R^2=0,999$. Hệ số a của phương trình khác 0 có ý nghĩa điều này nói lên phương pháp mắc hệ số ngẫu nhiên. Phương pháp có giới hạn phát hiện (LOD) là 0,36 $\mu\text{g/ml}$ và giới hạn định lượng (LOQ) 1,212 $\mu\text{g/ml}$.

Trong phân tích GA3, cơ chất thực vật có ảnh hưởng trực tiếp đến kết quả phân tích. Làm sạch là giai đoạn quan trọng, GA3 là một hoocmon thực vật có tính axit yếu và phân tích trên nền mẫu rau.

Hoạt chất GA3 được chiết ra khỏi nền mẫu bằng Etylaxetat trong môi trường axit. Chúng tôi tiến hành khảo sát dung dịch chiết mẫu với dung dịch HCl ở các nồng độ khác nhau, làm thí nghiệm lặp lại 3 lần (n=3). Mẫu khảo sát là mẫu rau cải đối chứng được thêm chuẩn.

Tiến hành khảo sát ảnh hưởng nồng độ HCl đến hiệu suất thu hồi. Cân 10g mẫu đối chứng rau cải, thêm 0,2ml chuẩn GA3 500 $\mu\text{g/ml}$ sau đó thêm 5ml HCl có nồng độ khác nhau. Xử lý mẫu với quy trình chiết ở trên rồi mang đo phổ hấp thụ quang. Nồng độ mẫu được thêm chuẩn thu được tính theo đường chuẩn.

STT	Khối lượng mẫu (g)	CHCl ₃ (M)	Nồng độ GA3 có trong mẫu ($\mu\text{g/ml}$)	Nồng độ GA3 thu được ($\mu\text{g/ml}$)	Hiệu suất (%)	
1	200	0,01	9,739	17,181	10	79,12
2	200	0,05	9,761	17,663	10	84,67
3	200	0,1	11,98	20,447	10	85,4
4	200	0,5	12,051	20,591	10	71,02
5	200	1,0	9,541	16,059	10	65,18
6	200	1,5	9,361	15,807	10	64,46

Độ chụm là đại lượng dùng để chỉ mức độ gần nhau của các giá trị riêng lẻ xi của các phép đo lặp lại. Nói cách khác độ chụm được dùng để chỉ sự sai khác giữa các giá trị xi \rightarrow so với giá trị trung bình, đại lượng đặc trưng cho độ chụm là độ lệch chuẩn tương đối %RSD (hay còn gọi là hệ số biến thiên CV) được tính theo công thức sau:

Trong đó: SD là độ lệch chuẩn

Stb là độ hấp thụ quang trung bình

Ta thấy trên nền mẫu rau cải có độ chụm tốt nhất sau đó đến rau diếp cá và cuối cùng là rau muống. Phương pháp cho độ chụm tốt %RSD=2,26-3,79 tại nồng độ thêm chuẩn 10 μ g/ml và %RSD=0,612-0,97 tại nồng độ thêm chuẩn 20 μ g/ml. Điều này là hợp lý do quy trình đơn giản và không phải làm giàu.

Để đánh giá độ đúng của phương pháp ta dùng dung dịch chuẩn GA3 có nồng độ là 10 μ g/ml và 20 μ g/ml. Đo lặp lại 5 lần, dựa vào đường chuẩn tính được nồng độ của các lần đo. Nồng độ của 5 lần đo là 9,98; 10,01; 10,02; 10,03, 9,98 (μ g/ml) với nồng độ 10 μ g/ml và 19,96; 19,98; 20,1; 20,06; 20,03 (μ g/ml).

Biến

C(μ g/ml)	N	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Độ sai chuẩn	Khoảng tin cậy	t
10	5	10,006	0,0261	0,0117	(9,9736; 10,0384)	0,514
20	5	20,026	0,0573	0,0256	(19,9549; 20,097)	1,014

Ta có t_{nh} = 0,514 và 1,014 < t_{bảng} (0,95; 4) = 2,78 chứng tỏ giá trị trung bình và giá trị thực sai khác nhau không đáng kể tức là phương pháp có độ đúng chấp nhận được.

Để xác định thành phần hàm lượng hoạt chất ta cân 1g mỗi loại phân bón, sau đó hòa tan lượng phân bón đó trong 100ml etanol tuyệt đối. Lấy 1ml mẫu trên cho vào các bình định mức 10ml. Thêm 1ml etanol tuyệt đối, sau đó định mức bằng dung dịch HCl 3,75M thu được 10ml mẫu. Sau đó mang đi đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 254nm với dung dịch so sánh là mẫu chứa nền mẫu là HCl 3,75M và etanol tuyệt đối. Mỗi loại phân bón đo lặp lại 3 lần. Xác định nồng độ GA3 trong phân bón dựa vào đường chuẩn.

Phân trăm GA3 có trong thuốc kích thích sinh trưởng là: viên sủi GA3 17,07%; tăng phot 920 20,66; an khang 20WT 21,12% và megafram 200WT 20,96%.

Dư lượng là lượng hoạt chất thuốc bảo vệ thực vật, dẫn xuất và các sản phẩm chuyển hóa của thuốc bảo vệ thực vật có độc tính còn lưu lại trong nông sản hàng hóa và môi trường sau khu sử dụng thuốc bảo vệ thực vật. Thời gian cách ly là khoảng thời gian tối thiểu kể từ ngày sử dụng thuốc bảo vệ thực vật lần cuối cùng đến ngày thu hoạch sản phẩm trong quá trình trồng trọt hoặc thời gian tối thiểu từ khi sử dụng thuốc bảo vệ thực vật lần cuối đến khi sử dụng sản phẩm trong quá trình bào quản. Để khảo nghiệm thời gian cách ly chúng tôi lấy mẫu ở các thời điểm sau xử lý 1, 2, 3, 4, 5 ngày.

Trong quá trình xác định dư lượng chúng tôi tiến hành phân tích lặp lại 2 lần lấy kết quả trung bình. Chúng tôi sử dụng đường chuẩn để xác định nồng độ của GA3 trong mẫu khảo nghiệm.

Thu được các đồ thị như sau:

Hình 1: Biểu diễn dư lượng thuốc kích thích sinh trưởng trên rau cải

Hình 2: Diễn biến dư lượng thuốc kích thích sinh trưởng trên rau diếp cá

Hình 3: Diễn biến dư lượng thuốc kích thích sinh trưởng trên rau muống

Kết quả phân tích dư lượng GA3 tại một số thời điểm trên rau cải, rau diếp cá và rau muống (bảng 3.14; 3.15 và 3.16 và hình 3.4, 3.5 và 3.6) cho thấy:

- Dư lượng GA3 nếu dùng lượng 10ml/mg/m² đối với tất cả phân bón chỉ cần sau 2 ngày dưới mức dư lượng tối đa. Khi gấp đôi lượng lượng trên sau 3 ngày phun lượng GA3 dưới mức dư lượng tối đa. Còn đối với liều lượng gấp 5 lần, 10 lần phải sau 5 ngày phun (theo MRL của Nhật bản: 0,2mg/kg đối với rau).

- Sau 5 ngày phun dư lượng gibberillic axit rong rau nhỏ hơn LOQ tại tất cả các liều sử dụng

Như vậy, luận văn của tôi đã thực hiện được những vấn đề sau

1. Đã khảo sát và chọn được thông số tối ưu cho quá trình đo phổ của axit gibberillic dung dịch định mức HCl nồng độ 3,75M, thể tích etanol thêm vào là 1ml và thể tích nước thêm vào là 0ml.
2. Xây dựng được quy trình xử lý mẫu tách GA3 ra khỏi rau có lẫn dung môi mẫu chiết là dung dịch đệm photphat pH 7,4. Sử dụng HCl có nồng độ trong khoảng 0,1M đến 0,05M là tối ưu cho hiệu suất thu hồi.

3. Tiến hành đánh giá phương pháp phân tích cho thấy: Phương pháp cho độ chụm tốt %RSD=2,26-3,79 tại nồng độ thêm chuẩn 10 μ g/ml và %RSD=0,612-0,97 tại nồng độ thêm chuẩn 20 μ g/ml. Phương pháp có độ đúng chấp nhận được. Với đường chuẩn thu được, khi so sánh hệ số a với 0 ta thấy có sự khác nhau có ý nghĩa hay phương pháp không mắc sai số hệ thống.

4. Khảo nghiệm thời gian cách ly cho thấy sau 5 ngày phun lượng GA3 tồn dư trong rau đều nhỏ hơn LOQ tại tất cả các liều lượng. Sau 5 ngày dư lượng GA3 ở mức cho phép (theo MRL của Nhật bản: 0,2mg/kg đối với rau).

References

Tiếng Việt.

1. Bùi Tuấn Anh, Võ Văn Bé, Phạm Thị Nga, (2008), “Sinh học đại cương”. <http://vietsciences1.free.fr/vietscience/giaokhoa/biology/sinhocdaicuong/chuong43sinhsandieuhosinhtrong.htm>
2. Bộ Nông nghiệp và PTNT, (1999), “Phương pháp lấy mẫu kiểm định chất lượng và dư lượng thuốc BVTV” 10TCN 386-99.
3. Bộ Nông nghiệp và PTNT, (2000), ”Khảo nghiệm trên đồng ruộng hiệu lực phòng trừ dòi đục lá hại rau các thuốc trừ sâu”, 10 TCN 415 - 2000.
4. Bộ Nông nghiệp và PTNT, (2011), “Danh mục các loại thuốc được phép sử dụng ở Việt Nam”, 2011.
5. Chất điều hòa sinh trưởng:
http://rausach.com.vn/forum_post.asp?TTD=644&titile=chdt-iu-ho-sinh-truong
6. Cục Bảo vệ thực vật, (2002), “Gibberellic acid Thuốc kỹ thuật và thành phẩm” Tiêu chuẩn cơ sở TC 10/2002.
7. Cục Bảo vệ thực vật, “ Nghiên cứu phát triển phương pháp phân tích đa dư lượng thuốc bảo vệ thực vật trong rau bằng sắc ký khí, phục vụ kiểm soát nông sản an toàn”.
<http://cis.ppd.gov.vn/?module=article&id=33>
8. Vũ Thị Hà Giang, Cao Xuân Hiếu, Nguyễn Trọng Bình, Vũ Mạnh Huỳnh, Nguyễn Quốc Vọng, (2008), “Về việc phun gibberellin vào rau sống” <http://www.thuvienkhoahoc.com>.
9. Trần Tứ Hiếu, Từ Vọng Nghi, Nguyễn Văn Ri, Nguyễn Xuân Trung, (2003) Hoá học phân tích - Phần 2: Các phương pháp phân tích công cụ, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội..

10. Đào Văn Hoảng, (2005), Kỹ thuật tổng hợp các hóa chất bảo vệ thực vật, Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, Hà Nội, pp 299-325.
11. Phạm Luận, (2010), Giáo trình phương pháp phân tích phổ hấp thụ phân tử UV-VIS, Trường ĐH Khoa học Tự nhiên – ĐH Quốc gia Hà Nội.
12. Tạ Thị Thảo, (2009), Giáo trình giảng dạy thống kê trong hoá phân tích, Trường ĐH Khoa học tự nhiên-ĐH Quốc gia Hà Nội.
13. Thuốc kích thích sinh trưởng Gibberillin,
<http://www.bvtvhcm.gov.vn/handbook.php?id=13&cid=1>
14. Trần Minh Trung, (2010), Nghiên cứu thành phần hoạt chất, hiệu lực kích thích sinh trưởng và xác định dư lượng một số chế phẩm kích thích sinh trưởng đang sử dụng trên rau hiện nay, Luận văn thạc sĩ, ĐH Bách khoa Hà Nội.
15. Chu Phạm Ngọc Sơn, (2007), Vệ sinh an toàn thực phẩm, một vấn đề xã hội bức xúc cần phải được giải quyết sớm và có hiệu quả, Hồ Chí Minh.

Tiếng anh

16. Thumnoon Nhujak, Monpichar Srisa-art, Kanayrat Kalampakorn, Vasana Tolieng, and Amorn Petsom (2005), “Determination of Gibberellic acid in Fermentation Broth and Commercial Products by Micellar Electrokinetic Chromatography”, J.Agric.Food Chem. 53, 1884-1889.
17. Julio Berrios, Andres Illanes, German Aroca, (2004), “Spectrophotometric method for determining gibberellic acid in fermentation broths”, Biotechnology, 26, pp. 67-70.
18. M.Sternberg, R.Voinescu, (1961), “A Chromatographic Determination of Gibberellic Acid”, Folia Microbiologica, 6.
19. Allan A.Holbrook, W.J.W.Edge, Fred Bailey, (1961), “Spectrophotometric method for determination of Gibberellic acid”, Advances in Chemistry, 28.
20. CDS Tamlin. 2003, The Pesticide Manual Thirteenth Edition, Harcourt College Publishers, NewYork pp 508-509.
21. Donal L. Pavia, Gary M. Lampman, Georges S. Kriz. (2001), Introduction to spectrometry. A guide for student of organic chemistry, Harcourt College Publishers, NewYork, London, Tokyo.
22. Gibberellins, 2008. <http://www.plant-hormones.info/gibberellins.htm>
23. GA3 http://en.wikipedia.org/wiki/Gibberellic_acid
24. Newzealand food safety authority. (1999), Maximum residue limits (MRLs) for specified Agricultural compound in food. Proposed amendment to the Newzealand (MRL of agricultural

compounds) mandatory food standard, 1999.

<http://www.nzfsa.govt.nz/acvm/publications/agvetlink/issue-24/article7.htm>.

25. The Japan Food Chemical Research Foundation,

http://www.m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/agrdtl.php?a_inq=31800