

XÁC ĐỊNH NHÓM CHỈ THỊ SINH HÓA SULHYDRYL (-SH) CHO SỰ Ô NHIỄM ASEN VÀ ĐỒNG CỦA CÂY RAU MÁ (CENTELLA ASIATICA)

Đến Tòa soạn 21-6-2007

NGUYỄN THỊ KIM PHƯỢNG, NGUYỄN THỊ DUNG, NGUYỄN CỬU KHOA

Viện Công nghệ Hóa học Tp. Hồ Chí Minh

SUMMARY

Plants can produce Cys-rich peptides such as triptide or glutathione (GSH), polypeptide, etc. when exposed to an excess amount of heavy metals. These peptides are rapidly synthesized in response to toxic levels of heavy metals in all tested plants. Amount of (-SH) groups indicated the level of contamination. Total (-SH) groups in pennywort were quantitated with Ellman's reagent by spectrophotometer in absorbance at 412nm. Arsenic, copper-peptide complexes were identified by HPLC with a Phenomenex Ultracarb 7ODS30 (250mm×4.6 mm i.d.×10 μm) column, mobile phase A: 40% H₂O, B: 40% acid formic 2.5% and C: 20% methanol; detector Diod Array UV at 275 nm. The results showed that uptaken and accumulation an excess amount of As, Cu is caused increasing indicator (-SH) groups in pennywort. This indicated that pennywort is very sensitive to As and Cu in terms of the rapid increases in the levels of GSH.

I - MỞ ĐẦU

Hấp thu và tích lũy kim loại đã kích thích phản ứng sinh tổng hợp glutathion hay tripeptit (GSH) xảy ra trong cây. GSH là hợp chất hữu cơ chứa 01 nhóm (-SH), đảm nhiệm vai trò tạo phức với kim loại thông qua nhóm (-SH) [3,4]. Sự tạo thành các chuỗi polypeptit và các phức chất từ GSH tùy thuộc vào bản chất hóa học của kim loại và đặc điểm sinh hóa của thực vật. Vì vậy, việc xác định tổng lượng (-SH) và các dạng phức của GSH với kim loại trong cây rau nhằm làm sáng tỏ cơ chế khử độc thông qua các phản ứng hóa học trong quá trình tích lũy và lan truyền kim loại từ môi trường đất lên cây trồng. Vì vậy, mục tiêu của nghiên cứu là xác định nhóm chỉ thị (-SH) và phức chất của polypeptit với As, Cu của cây rau má (*Centella Asiatica*) sinh trưởng trong môi trường đất giàu As, Cu. Định lượng nhóm (-SH) bằng phương pháp so màu với tác nhân Ellman và xác định phức chất

trong cây rau bằng kỹ thuật sắc ký lỏng cao áp (HPLC) đã được sử dụng trong nghiên cứu này [2, 4, 6].

II - THỰC NGHIỆM

1. Hóa chất

- Các hóa chất được sử dụng trong nghiên cứu này bao gồm: Glutathion (GSH) và 5,5'-dithiosbis-2-nitrobenzoic axit (DTNB), Sigma; axit trichloroaxetic (TCA), Merck; K₂HPO₄, Na₂-EDTA, Prolabo.

- Thành phần của tác nhân Ellman: 6 mmol DTNB, 0,143 mmol K₂HPO₄, 6,3 mmol Na₂-EDTA, pH = 7,5).

2. Chuẩn bị mẫu phân tích

- Rau má được trồng trên đất ô nhiễm As [NaAsO₂] và Cu [CuSO₄.5H₂O], với nồng độ khác nhau. Thu hoạch sau 4 và 9 tuần kể từ lúc

trồng, rửa sạch bằng nước cất, tách riêng phần rễ và lá, sấy khô ở 60°C trong 72 giờ. Mẫu đối chứng là rau được trồng trên đất nền không ô nhiễm trong cùng điều kiện như nhau.

- Quy trình xử lý mẫu

1. *Vô cơ hóa mẫu*: bằng hỗn hợp axit HNO₃:HCl (10:3), ở nhiệt độ 165°C trong 15 phút trên thiết bị vi sóng MarsX 5 plus (Mỹ). Định lượng As, Cu bằng phương pháp AAS lò graphit, GBC UltraZ (Úc).

2. *Định lượng (-SH) trong mẫu rau* [2, 6]: Chiết (-SH) bằng dung dịch TCA 6,7% ở 4°C. Thêm tác nhân Ellman vào dịch chiết, sau 2 phút đo trên máy quang phổ so màu LBK Biochrom Ultrospec II (Anh) ở bước sóng $\lambda = 412\text{nm}$.

3. *Xác định dạng phức chất trong rau má*: trên thiết bị HPLC 200 series, Perkin Elmer [4, 6] với các điều kiện như sau:

Điều kiện	Đơn vị, ký mã hiệu
Cột tách sắc ký	Phenomenex Ultracarb 7ODS30 (250 m×4,6 mm i.d.×10 μm)
Pha động	40% A: H ₂ O; 40% B: axit formic 2,5% và 20% C: metanol
Tốc độ dòng pha động	0,5ml/min
Detector UV	Diod Array 235C, $\lambda = 275\text{nm}$

III - KẾT QUẢ THẢO LUẬN

1. Ảnh hưởng của nồng độ As đến sự thay đổi thiol (-SH) trong cây rau má

Kết quả phân tích As tổng và lượng (-SH) trong cây rau má được trình bày trong bảng 1. Kết quả ở bảng 1 cho thấy sự tích lũy As trong cây rau má đã tác động mạnh đến phản ứng sinh hóa xảy ra trong cây đặc biệt là ở giai đoạn

trưởng thành. Lượng As đưa vào đất tăng làm tăng tích lũy As trong cây rau má và tăng nhóm chỉ thị (-SH). So sánh tuần thứ 4 và tuần thứ 9 nhận thấy: Lượng As tích lũy trong rễ tăng 1,5 lần nhưng số lượng nhóm chỉ thị (-SH) lại giảm 1,6 lần. Ngược lại, hàm lượng As tích lũy trong lá rau má tăng khoảng 2 lần nhưng số lượng nhóm chỉ thị (-SH) trong lá rau má tăng khoảng 5 lần (xem hình 1).

Bảng 1: Ảnh hưởng của nồng độ asen trong đất tới sự tích lũy và thay đổi nhóm (-SH) trong cây rau má

Đất trồng rau	Tích lũy As, mg/kg				Nhóm chỉ thị (-SH) (mmol/kg × 10/3)				
	Lá		Rễ		Lá		Rễ		
	4 tuần	9 tuần	4 tuần	9 tuần	4 tuần	9 tuần	4 tuần	9 tuần	
Đối chứng	0,46±0,12	0,59±0,12	0,51±0,15	0,60±0,12	174±14	223±19	221±15	168±14	
Ô nhiễm As (mg/kg đất)	20	0,85±0,37	1,66±0,45	0,87±0,17	1,36±0,18	228±21	1172±29	295±25	178±23
	25	0,98±0,44	2,11±0,45	1,09±0,25	1,51±0,26	237±28	1381±44	309±22	186±15
	30	1,12±0,39	2,33±0,50	1,20±0,28	1,70±0,33	296±34	1655±24	426±39	253±24
	50	1,68±0,51	3,14±0,36	1,77±0,37	2,68±0,55	353±30	1853±53	491±48	263±18

Có thể giải thích cho sự tăng và giảm số lượng nhóm (-SH) trong cây rau má như sau: thành tế bào rễ có cấu tạo bởi mạng lưới xenlulo, pectin... với các nhóm choc năng

cacboxyl mang điện tích âm nên luôn có khuynh hướng đẩy các anion asenat [1]. Vì vậy, As sau khi đi vào rễ tiếp tục di chuyển lên phần trên nên đã giảm sự sinh tổng hợp GSH tại rễ.

Lượng As sau di chuyển lên lá thì tích tụ tại đó và kích thích phản ứng sinh tổng hợp GSH. Nhóm (-SH) được sử dụng như một chất chỉ thị (biochemical indicator) để đánh giá mức độ ô nhiễm và độc tính của từng kim loại đối với từng loài thực vật [3].

2. Ảnh hưởng của Cu đến sự thay đổi nhóm (-SH) trong cây rau má

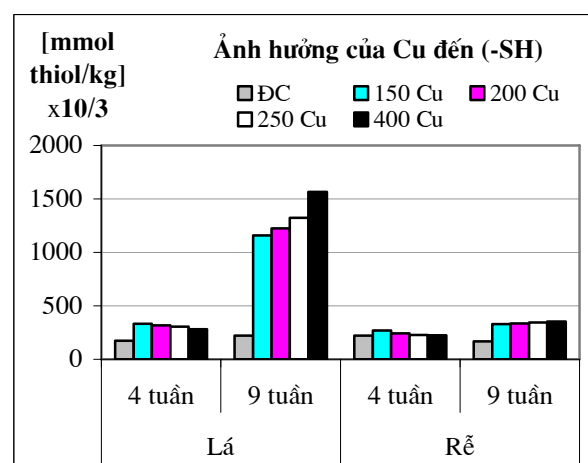
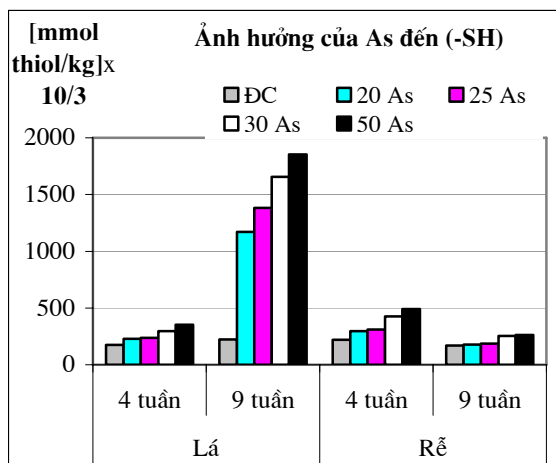
Kết quả phân tích lượng Cu tổng và nhóm chỉ thị (-SH) trong cây rau má được trình bày trong bảng 2.

Các kết quả phân tích cho thấy sự tích lũy Cu trong cây tăng cùng với mức độ ô nhiễm đất và thời gian sinh trưởng. Sự tích tụ Cu trong rễ nhiều hơn trong lá đặc biệt là ở tuần thứ 9, lượng Cu tích tụ trong rễ cao gấp khoảng từ 2

đến 5 lần so với trong lá. So sánh tuần thứ 4 với tuần thứ 9 nhận thấy: lượng Cu tích tụ trong lá tăng khoảng từ 2 đến 3 lần trong khi đó ở rễ tăng khoảng từ 2 đến 5 lần; số lượng nhóm (-SH) trong rễ rau má chỉ tăng khoảng 1,5 lần trong khi đó ở lá rau má thì tăng từ 5 đến 6 lần. Điều này có liên quan đến bản chất của kim loại đồng. Ion Cu^{2+} có khuynh hướng liên kết với các nhóm chức năng cacboxyl của thành tế bào rễ, vì vậy ngay cả khi Cu tích tụ lại ở rễ nhiều nhưng không ở dạng ion tự do vì vậy đã không kích thích phản ứng tạo GSH ở rễ. Tại lá, sau khi di chuyển lên lá đồng sẽ tồn tại ở dạng ion Cu^{2+} tự do, chính ion tự do này đã kích thích phản ứng tổng hợp GSH, do đó làm tăng nhanh chóng số lượng nhóm (-SH).

Bảng 2: Ảnh hưởng của nồng độ đồng trong đất tới sự tích lũy và thay đổi nhóm (-SH) trong cây rau má

Đất trồng rau	Tích lũy Cu (mg/kg)				Nhóm chỉ thị (-SH) (mmol/kg × 10/3)				
	Lá		Rễ		Lá		Rễ		
	4 tuần	9 tuần	4 tuần	9 tuần	4 tuần	9 tuần	4 tuần	9 tuần	
Đối chứng	11,70±2,73	12,18±2,34	19,54±4,17	24,37±3,19	174±14	223±19	221±15	168±14	
Ô nhiễm Cu (mg/kg đất)	150	12,86±3,36	23,73±2,63	29,11±3,96	48,87±5,96	331±17	1158±54	268±36	329±38
	200	13,65±3,19	35,22±3,38	31,92±5,11	84,21±11,15	318±26	1224±43	243±27	335±26
	250	14,99±2,86	36,52±4,63	36,65±5,99	117,16±14,17	306±26	1324±50	229±23	344±32
	400	17,52±2,61	44,83±5,03	64,33±11,63	213,65±17,54	282±28	1565±66	225±25	354±35



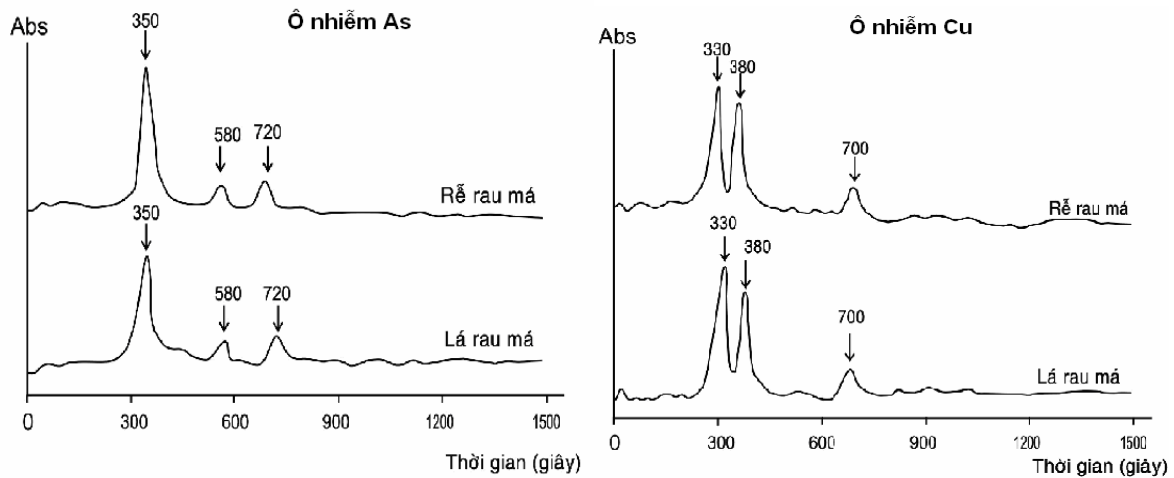
Hình 1: Ảnh hưởng của As, Cu tới sự thay đổi nhóm (-SH) trong cây rau má

Tóm lại, toàn bộ kết quả nghiên cứu cho thấy cây rau má hấp thu As ít hơn Cu; lượng As tích tụ lại ở rễ ít hơn so với lượng As di chuyển lên lá ngược lại hàm lượng Cu bị cố định lại ở vùng rễ nhiều hơn là vận chuyển lên lá. Số lượng nhóm (-SH) trong lá rau má ô nhiễm As hay Cu đều tăng, số lượng nhóm (-SH) ở tuần thứ 9 cao hơn tuần thứ 4 khoảng từ 5 đến 6 lần. Ngược lại, số lượng nhóm (-SH) trong rễ chỉ tăng 1,5 đối với rau má nhiễm Cu và giảm 1,6

lần đối với rau má ô nhiễm As.

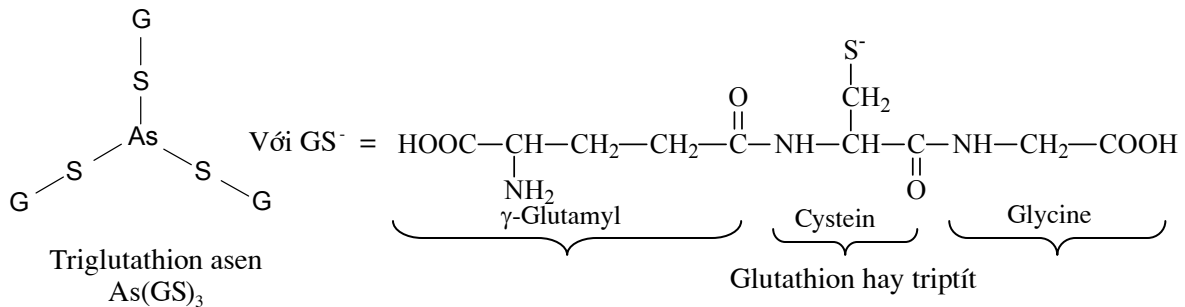
3. Xác định hợp chất của As và Cu trong cây rau má

Tripeptit hay glutathion (GSH) có công thức chung (γ -Glutamyl-cystein-glycin) đảm nhiệm vai trò tạo liên kết với kim loại trong cây [3], theo đó các kim loại As, Cu sau khi đi vào cây sẽ tạo liên kết với nhóm (-SH). Kết quả phân tích dịch chiết trong lá và rễ rau má được thể hiện trên 2 sắc ký đồ hình 2.

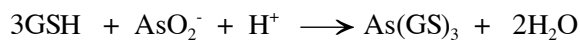


Hình 2: Sắc ký đồ phân tích dịch chiết của cây rau má ô nhiễm As, Cu

Kết quả định tính cho thấy có các pic đặc trưng ở các thời gian lưu 350, 580 và 720 giây, đều xuất hiện ở lá và rễ rau má ô nhiễm As. Đỉnh xuất hiện ở 350 giây chính là triglutathion asen biểu diễn như sau:



Phản ứng giữa glutathion và anion asenit:

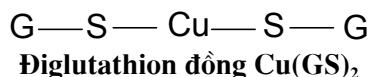


Các pic ở 580 và 720 giây là các polypeptit có phân tử lượng lớn hơn [(γ -Glutamyl-Cystein)_nGlycine với n = 2 - 11]. Theo các tác

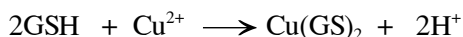
giả [3], song song với sự sinh tổng hợp GSH là phản ứng trùng hợp tạo thành polyme có trọng lượng phân tử lớn hơn từ GSH. Mức độ trùng hợp tùy thuộc vào đặc điểm sinh học của thực vật, nồng độ và bản chất của kim loại tích lũy.

Trong trường hợp Cu, thu được các pic ở các

thời gian lưu 330, 380 và 700 giây. Đỉnh xuất hiện ở 330 giây chính là diglutathion đồng Cu(GS)₂ công thức hóa học như sau:



Phản ứng giữa glutathion và cation đồng:



Còn các đỉnh ở 380 giây, 700 giây là những pic của polypeptit có trọng lượng phân tử lớn hơn. Quy luật này như nhau cả trong dịch chiết của rễ và lá rau má.

IV - KẾT LUẬN

- Rau má hấp thu, vận chuyển As lên lá nhiều hơn là cố định lại ở rễ. Số lượng nhóm (-SH) trong rễ giảm từ tuần thứ 4 đến tuần thứ 9 ngược lại trong trường hợp lá rau má số lượng nhóm tăng.

- Trong trường hợp Cu, cây rau má hấp thu nhiều và chủ yếu cố định ở rễ hơn là vận chuyển lên lá. Số lượng nhóm (-SH) trong lá và rễ đều tăng từ tuần thứ 4 đến tuần thứ 9. Tuy nhiên sự tăng nhóm (-SH) trong rễ không đáng kể như trong lá.

- Tích lũy As, Cu trong cây rau má đã kích thích hàng loạt phản ứng trong cây: sinh tổng hợp GSH, tạo phức với As và Cu, tạo thành các polypeptit có trọng lượng phân tử khác nhau. Nói lên sự đa dạng của các phản ứng sinh hóa

xảy ra trong cây tùy thuộc vào đặc điểm sinh thái của từng loại rau, nồng độ và bản chất của kim loại... Phản ứng sinh hóa trong cây đã làm giảm mức độ độc hại của kim loại tự do đối với cây rau.

Lời cảm ơn: Tác giả xin chân thành cảm ơn Viện Công Nghệ Hóa Học tại Thành phố Hồ Chí Minh, Khoa Tài nguyên Thiên nhiên và Khoa học Môi trường của Trường Đại học Nevada tại Reno, Mỹ đã tạo điều kiện thuận lợi để tác giả thực hiện công trình này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. M. Greger. Uptake of nuclides by plants. Technical report TR-04-14. Sweden (2004).
2. Henk S, Mechteld MAK. Plant physiol., 99, 1475 - 1480 (1992).
3. Inouhe M. Phytochelatins. Braz. J. Plant Physiol., 17 (1) 67 - 78 (2005).
4. E. V. S. Marcus, Matjaz Oven, Erwin Grill. J. Am. Soc. plant physiologist. 112, 793 - 801 (2000).
5. W. E. Rauser. Phytochelatin and related peptides; structure, biosynthesis and function. Plant Physiol, 109, 1141 - 1149 (1995).
6. Shih-Long Y., Chien-Chiang T., Yung-Reui C. Proc. Natl. Sci. Council. ROC (B) 24, 202 - 207 (1999)