Thesis Title	Development of Chromatographic-Mass Spectrometric Methods for the Analysis of Flowering Regulators of Longan Trees Treated with Potassium Chlorate
Author	Miss Chanthana Susawaengsup
Degree	Doctor of Philosophy (Chemistry)
Thesis Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Mongkon Rayanakorn — Advisor
	Assoc. Prof. Dr. Sugunya Wongpornchai — Co-advisor
	Asst. Prof. Dr. Sunanta Wangkarn — Co-advisor

ABSTRACT

In this research chromatographic-mass spectrometric methods were employed to analyze plant hormones involving in off-season flowering of ten longan trees *(Dimocarpus longan Lour.)* treated with potassium chlorate in comparison with ten untreated longan trees in the experimental orchard of Maejo University in Sansai District of Chiang Mai, Thailand. Prior to the analysis at the Chemistry Department, Faculty of Science, Chiang Mai University, methods for extraction and clean-up of plant hormones were developed. Shoot tips of longan trees were used as samples for the selection of a

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

suitable solvent for extraction of plant hormones. It was found that modified Bieleski's solvent consisting of MeOH:H_2O:formic acid (15:4:1 v/v) was the most suitable solvent when employed together with single mixed-mode solid phase extraction using C8/SCX to remove interfering matrices in the longan shoot tip samples spiked with plant hormone standards. This developed method of extraction and clean-up yielded plant hormone standard recoveries in the range of 72-112%.

Endogenous levels of indole-3-acetic acid (IAA), gibberellins (GAs), abscisic acid (ABA) and cytokinins (CKs) were investigated in shoot tips of ten longan trees treated with potassium chlorate and ten untreated longan trees. Collection of longan shoot tips was carried out at 2-5 day interval from four days before application of potassium chlorate until 60 days after the application. Each sample comprised approximately 100 shoot tips collected randomly from ten longan trees for both the treated and control sources. All samples were kept in liquid nitrogen, freezed-dried and ground to a powder prior to analysis.

Analysis for plant hormones in the longan shoot tip samples was performed using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-ESI-MS) under optimum conditions. The column used was a Zorbax SB C18 (2.1 mm × 100 mm i.d., 3.5 µm) and the mobile phase was 0.1% acetic acid in methanol and 0.1 % acetic acid in water suitably mixed under a linear gradient program. The optimized LC-ESI-MS conditions include the following parameters: capillary voltage 4500 V, nebulizer pressure 25 psi, gas temperature 330°C, nitrogen gas flow rate 10 L min^{-1} and fragmentation 80 V for positive mode and and 70 V for negative mode. With the limits of detection and limits of

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

quantitation ranged from 10-200 and 20-600 ng mL^{-1}, respectively, it was found that gibberellins A1 (GA1), gibberellic acid (GA3), gibberellins A19 (GA19) and gibberellin A20 (GA20) levels (25, 50, 20, and 60 ng g^{-1} dry weight), in the longan shoot tips contribute to flower bud induction while levels of isopentenyl adenine (iP), isopentenyl adenosine (iPR) and dihydrozeatin riboside (DHZR) at 20, 50 and 60 ng g^{-1} dry weight in the control longan contribute more to the vegetative development.

Results obtained with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) employing an electron ionization source and a quadrupole mass analyzer under optimum conditions reveal that 53 components were detected in longan shoot tips from both the control and treated sources. Of the 53 detected components, 33 components were identifiable and 20 components were unknown. The compounds detected by GC-MS in this work were mainly terpenoid compounds and alkanes which are largely more volatile than plant hormones detected by LC-ESI-MS. The results obtained could not be concluded whether potassium chlorate caused any significant changes in volatile components in the samples analyzed by GC-MS. Attempts were also made in searching for chlorinated compounds in the longan shoot tip samples by GC-MS and liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (LC-ESI-q-Tof-MS) and it can be concluded that no chlorinated compounds were detected from the isotopic patterns of chlorine atoms in all of the mass spectra obtained from these two techniques.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การพัฒนาวิธีการทางโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรีสำหรับการวิเคราะห์สารควบคุมการออกดอกของต้นลำไยที่ใส่โพแทสเซียมคลอเรต

ผู้เขียน นางสาว ฉันทนา ซูแสวงทรัพย์

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. มงคล รายะนาคร	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
รศ. ดร. สุกัญญา วงศ์พรชัย	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผศ. ดร. สุนันทา วังกานต์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้ใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรีในการศึกษาวิเคราะห์ฮอร์โมนพืชที่เกี่ยวข้องกับการออกดอกของต้นลำไยนอกฤดูกาล โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างต้นลำไยที่ให้สารโพแทสเซียมคลอเรตจำนวนสิบต้นกับต้นลำไยที่ไม่ได้ให้สารจำนวนสิบต้นที่ปลูกอยู่ในบริเวณสวนทดลองของมหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ ก่อนการวิเคราะห์ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ได้ทำการพัฒนาวิธีการสกัดและทำความสะอาดฮอร์โมนพืช ตัวอย่างยอดลำไยได้ถูกเลือกใช้ให้เป็นตัวอย่างในการทดลองเพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดฮอร์โมนพืช พบว่าตัวทำละลายผสมที่ปรับมาจากของ Bieleski ในอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำต่อกรดฟอร์มิก 15:4:1 โดยปริมาตรเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดเมื่อใช้ร่วมกับการสกัดด้วยของแข็งแบบผสม C8/SCX ในการกำจัดสารรบกวนออกจากตัวอย่างที่ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เติมสารมาตรฐานฮอร์โมนลงไป วิธีการสกัดและทำความสะอาดนี้ให้มีค่าร้อยละการกลับคืนของสารมาตรฐานฮอร์โมนพืชอยู่ในช่วง 72-112%.

ได้ทำการศึกษาหาระดับปริมาณของฮอร์โมนพืชของอินโดล-3-อะซีติก แอซิค (IAA), จิบเบอเรลลีน (GAs), กรดแอบซิสซิก (ABA) และ ไซโทไคนิน (CKs) ในยอดลำไยจากต้นที่ใส่สารโพแทสเซียมคลอเรตสิบต้นและจากต้นที่ไม่ได้ใส่สารโพแทสเซียมคลอเรตสิบต้น ทำการเก็บตัวอย่างตั้งแต่วันก่อนใส่สารโพแทสเซียมคลอเรต 4 วันและเก็บเว้นระยะ 2-5 วัน จนกระทั่งครบ 60 วันหลังจากให้สาร แต่ละตัวอย่างประกอบด้วยยอดลำไยประมาณ 100 ยอด ที่เก็บตัวอย่างแบบสุ่มจากต้นลำไยจำนวน 10 ต้นที่มีการให้สาร และเก็บตัวอย่างแบบเดียวกันกับต้นลำไยที่ไม่ได้ให้สาร ตัวอย่างทั้งหมดถูกเก็บในไนโตรเจนเหลว นำไปทำให้แห้งและบดให้เป็นผงก่อนทำการทดลอง

การวิเคราะห์ฮอร์โมนพืชในตัวอย่างยอดลำไยได้ใช้เทคนิคทาง LC-ESI-MS ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลอง ใช้คอลัมน์ Zorbax SB-C18 ที่มีขนาด 2.1 × 100 มิลลิเมตรและขนาดอนุภาคเท่ากับ 3.5 ไมโครเมตร ใช้เมทานอลที่มีสารละลายกรด 0.1% และน้ำที่มีกรดอะซิติกเข้มข้น 0.1% เป็นเฟสเคลื่อนที่ ด้วยอัตราการไหล 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที สภาวะที่เหมาะสมของ LC-ESI-MS ประกอบด้วยพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้คือ ค่าความต่างศักย์ในหลอดคาพิลลารี 4500 โวลท์ ค่าความดันในการสเปรย์ 25 พีเอสไอ อุณหภูมิของแก๊สร้อนที่ใช้ในการระเหยแห้ง 330 องศาเซลเซียล อัตราการไหลของแก๊สร้อนที่ใช้ในการระเหยแห้งเป็นค่าความต่างศักย์ในการแตกไอออน 10 ลิตรต่อนาทีและค่าศักย์ไฟฟ้าในการแตกตัว 80 โวลท์สำหรับรูปแบบการแตกตัวเป็นไอออนบวกและ 70 โวลท์สำหรับรูปแบบการแตกตัวเป็นไอออนลบ ด้วยค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดและขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณอยู่ในช่วง 10-200 และ 20-600 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ การวิเคราะห์พบว่าระดับของจิบเบอเรลลีนเอ 1 (GA1) จิบเบอเรลลีนเอ 3 (GA3) จิบเบอเรลลีนเอ 19 (GA19) และจิบเบอเรลลีนเอ 20 (GA20) (25, 50, 20 และ 60 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ในยอดลำไยที่มีส่วนสำคัญทำให้เกิดตาดอก ในขณะที่ระดับของไอโซเพนทีนิลอะดีนีน (iP) ไอโซเพนทีนิลอะดีโนซีน (iPR) และ ไดไฮโดรซีเอตินไรโบไซด์ (DHZR) เป็นฮอร์โมนพืชที่ช่วยในการสนับสนุนให้เกิดการพัฒนาทางใบ ตรวจพบในระดับสูงที่ 20, 50 และ 60 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของยอดลำไยจากต้นควบคุม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ส่วนผลการทดลองด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรี (GC-MS) ใช้เทคนิคการทำให้สารแตกตัวเป็นไอออนด้วยอิเล็กตรอนและควอดรูโพลเป็นตัวแยกและวิเคราะห์มวลโมเลกุลไอออนภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พบองค์ประกอบสาร 53 องค์ประกอบที่ตรวจพบทั้งในตัวอย่างยอดลำไยจากต้นที่ใส่และไม่ใส่สารโพแทสเซียมคลอเรต โดยใน 53 องค์ประกอบนี้สามารถระบุเอกลักษณ์ของสารได้ 33 องค์ประกอบและไม่สามารถระบุชนิดสารได้ 20 องค์ประกอบ โดยที่องค์ประกอบหลักที่ตรวจวัดได้ด้วยเทคนิค GC-MS ในงานวิจัยนี้เป็นสารกลุ่มเทอพีนอยด์และอัลแคนซึ่งจัดเป็นกลุ่มสารที่ระเหยได้ง่ายกว่าฮอร์โมนพืชที่ตรวจวัดได้โดยเทคนิค LC-ESI-MS ผลการทดลองที่ได้ไม่สามารถสรุปได้ว่าสารเหล่านี้เกิดการเปลี่ยนแปลงจากการให้สารโพแทสเซียมคลอเรต และไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญขององค์ประกอบสารระเหยในตัวอย่างที่วิเคราะห์โดย GC-MS นอกจากนี้ยังได้ทำในการค้นหาสารที่มีคลอรีนเป็นส่วนประกอบในตัวอย่างยอดลำไยโดยใช้เทคนิค GC-MS และ ลิควิดโครมาโทกราฟี-ควอดรูโพล-ไทม์ออฟไฟท์ แมสสเปกโทรเมตรี (LC-ESI-q-Tof- MS) และสามารถสรุปได้ว่าไม่มีสารที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบอยู่ในตัวอย่างจากการตรวจไอโซโทปของอะตอมคลอรีนในสเปกตรัมทั้งหมดที่ได้จากการวิเคราะห์ทั้งสองเทคนิค

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved