

**SOURCE IDENTIFICATION OF ELEPHANT IVORY AND RICE
BASED ON MULTI-ELEMENT FINGERPRINTING AND
SELENOPROTEOMIC ANALYSIS OF RICE USING
MASS SPECTROMETRY BASED APPROACHES**



PRACHA CHEAJESADAGUL

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(ANALYTICAL CHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

Copyright by Mahidol University 2014

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

SOURCE IDENTIFICATION OF ELEPHANT IVORY AND RICE BASED ON MULTI-ELEMENT FINGERPRINTING AND SELENOPROTEOMIC ANALYSIS OF RICE USING MASS SPECTROMETRY BASED APPROACHES

PRACHA CHEAJESADAGUL 5338219 SCAC/D

Ph.D. (ANALYTICAL CHEMISTRY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: ATITAYA SIRIPINYANOND, Ph.D., JUWADEE SHIOWATANA, Ph.D., JOANNA SZPUNAR, Ph.D., WARET VEERASAI, Dr.rer.nat.

ABSTRACT

The present PhD research is focused on analytical chemistry challenges based on mass spectrometry based approaches concerning source identification of elephant ivory and rice based on multi-element fingerprinting and selenoproteomic analysis of rice.

In the first part, the so-called micro-analytical technique, named laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) was developed for source identification of Asian and African elephant ivories. Thirty-seven ivory samples with known and unknown sources were directly analyzed after surface cleaning. Pre-ablation was used to avoid possible contribution from surface contaminants. Elemental compositions in each ivory sample were evaluated in term of intensity ratios. Calcium, which is a major matrix element in ivory, was used as an internal element to normalize elemental intensity and to correct for variations in ablation efficiency and plasma variation. Discriminant analysis (DA) with the use of 11 key variables (intensity ratios of Mg, P, Sc, Cr, Fe, Co, Zn, Ga, Rb, Sr and Ba with Ca) was employed to classify ivory samples. This study indicated that multi-element fingerprinting could be beneficial in determining the source of elephant ivory.

In the second part, the methods based on the multi-element fingerprinting by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) in combination with multivariate statistical techniques were developed and validated as tools for authentication of rice. A total of 31 Thai jasmine rice and 5 foreign (France, India, Italy, Japan and Pakistan) rice samples were analyzed after acid digestion. Twenty-one key variables (B, Mg, Al, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Rb, Sr, Mo, Cd, Cs, Ba, and Pb) were assessed by a radar plot technique and multivariate data analysis, including principal component analysis (PCA) and discriminant analysis (DA) enabling classification according to geographical origin. Thai jasmine rice could be clearly differentiated from foreign rice samples. In addition, the DA could be used to classify Thai jasmine rice obtained from different regions in Thailand including the northern, northeastern and central regions. The use of quantitative high-resolution and quadrupole semi-quant ICP-MS approaches was critically compared.

In the third part, an analytical ICP-MS-assisted proteomic method was developed for the identification of Se-containing proteins in rice grown naturally on seleniferous soils. Rice proteins were separated by two-dimensional (2D) gel electrophoresis. The position of Se-containing protein was tentatively identified by the correlation between one-dimensional isoelectric focusing electrophoresis (1D IEF) and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE) of a sample aliquot and then confirmed by ^{78}Se imaging in the 2D gels by laser ablation ICP-MS. Upon tryptic digestion, the proteins were identified by capillary HPLC with the dual ICP-MS and electrospray Orbitrap MS detection. Selenium was found to be present as both selenomethionine (SeMet) and selenocysteine (SeCys) in a dozen of rice proteins including a 19kDa globulin, granule-bound starch synthase, and the family of glutelin-type seed storage proteins. The Se/S substitution ratio was found to be two times higher for SeMet than that for SeCys.

KEY WORDS: MASS SPECTROMETRY / RICE / ELEPHANT IVORY / SOURCE IDENTIFICATION / GEOGRAPHICAL ORIGIN / MULTI-ELEMENT FINGERPRINTING / SELENIUM / SELENOPROTEOMIC ANALYSIS

196 pages

การระบุแหล่งที่มาของตัวอย่างงาช้างและข้าวโดยการวิเคราะห์ลายนิ้วมือธาตุ และการศึกษาโปรตีนที่มีธาตุซีลีเนียมเป็นองค์ประกอบในข้าว ด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางแมสสเปกโตรเมตรี

SOURCE IDENTIFICATION OF ELEPHANT IVORY AND RICE BASED ON MULTI-ELEMENT FINGERPRINTING AND SELENOPROTEOMIC ANALYSIS OF RICE USING MASS SPECTROMETRY BASED APPROACHES

ประชา เจริญภูากุล 5338219 SCAC/D

ปร.ด. (เคมีวิเคราะห์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: อติชยา ศิริกิจญานนท์, Ph.D., ยุวดี เชี่ยววัฒนา, Ph.D., โจแอนนา สเปนนา, Ph.D., วรศวีระชัย, Dr.rer.nat.

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้นำเสนอการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ทางแมสสเปกโตรเมตรี เพื่อใช้ในการระบุแหล่งที่มาของตัวอย่างงาช้างและข้าวโดยการวิเคราะห์ลายนิ้วมือธาตุ และการศึกษาโปรตีนที่มีธาตุซีลีเนียมเป็นองค์ประกอบในข้าว

ในงานวิจัยส่วนแรก เป็นการพัฒนาเทคนิคอินดักทีฟฟลิคซ์เฟลพลาสมา-แมสสเปกโตรเมตรีแบบใช้แสงเลเซอร์ สำหรับการตรวจหาแหล่งที่มาของตัวอย่างงาช้างเอเชียและตัวอย่างงาช้างแอฟริกา ตัวอย่างงาช้างทั้งที่ทราบและไม่ทราบแหล่งที่มา ทั้งหมด 37 ตัวอย่าง ถูกนำมาวิเคราะห์โดยตรงหลังจากทำความสะอาดพื้นผิว จากนั้น ตัวอย่างงาช้างจะถูกนำมายิงด้วยแสงเลเซอร์เพื่อสะกัดผิวก่อน เพื่อหลีกเลี่ยงสิ่งปนเปื้อนที่อยู่บนพื้นผิวของตัวอย่างงาช้างก่อนทำการวิเคราะห์จริง องค์ประกอบธาตุที่พบอยู่ในตัวอย่างงาช้าง ถูกนำมาประมวลผลในเทอมของอัตราส่วนค่าของสัญญาณ ธาตุแคลเซียม ซึ่งเป็นธาตุที่เป็นองค์ประกอบหลักในงาช้าง ถูกใช้เป็นธาตุมาตรฐานภายในสำหรับการวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้ เพื่อปรับค่าสัญญาณของธาตุให้ได้ค่าที่ปกติและเพื่อแก้ไขความแปรปรวนของสัญญาณที่เกิดจากประสิทธิภาพของการยิงสะกัดผิวและความแปรปรวนของพลาสมา ในงานนี้ การวิเคราะห์จำแนกประเภท ถูกนำมาใช้ในการจำแนกตัวอย่างงาช้าง โดยใช้ตัวแปรข้อมูล 11 ตัวแปร ในการศึกษาครั้งนี้ว่า ลายนิ้วมือธาตุนั้น สามารถนำมาใช้ประโยชน์เพื่อตรวจหาแหล่งที่มาของตัวอย่างงาช้างได้

ในงานวิจัยส่วนที่สอง เป็นการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ลายนิ้วมือธาตุ โดยใช้เทคนิคอินดักทีฟฟลิคซ์เฟลพลาสมา-แมสสเปกโตรเมตรี ร่วมกับการวิเคราะห์เชิงสถิติหลายตัวแปร เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบความถูกต้องของตัวอย่างข้าว ตัวอย่างข้าวหอมมะลิไทยทั้งหมด จำนวน 31 ตัวอย่าง และตัวอย่างข้าวจากต่างประเทศ จำนวน 5 ตัวอย่าง (ฝรั่งเศส, อินเดีย, อิตาลี, ญี่ปุ่น และปากีสถาน) ถูกนำมาวิเคราะห์หลังจากผ่านการย่อยด้วยกรด ตัวแปรข้อมูล 21 ตัวแปร ถูกนำมาประมวลผลโดยใช้กราฟไฮแมงมูมและการวิเคราะห์เชิงสถิติหลายตัวแปร ซึ่งประกอบไปด้วยการวิเคราะห์องค์ประกอบหลักและการวิเคราะห์จำแนกประเภท ทำให้สามารถจำแนกตัวอย่างข้าวที่สอดคล้องกับแหล่งที่มาทางภูมิศาสตร์นั้นๆ ได้ ในงานวิจัยนี้ ข้าวหอมมะลิไทยสามารถจำแนกออกจากข้าวจากต่างประเทศได้อย่างชัดเจน อีกทั้งเทคนิคการวิเคราะห์จำแนกประเภท สามารถที่จะใช้จำแนกข้าวหอมมะลิไทยที่มาจากภูมิภาคต่างๆในประเทศไทยได้ ซึ่งประกอบไปด้วย ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคกลาง นอกจากนี้ ยังได้ทำการเปรียบเทียบการใช้เทคนิคอินดักทีฟฟลิคซ์เฟลพลาสมา-แมสสเปกโตรเมตรีที่มีประสิทธิภาพสูงเพื่อการวิเคราะห์ธาตุเชิงปริมาณกับเทคนิคอินดักทีฟฟลิคซ์เฟลพลาสมา-แมสสเปกโตรเมตรีเพื่อการวิเคราะห์ธาตุเชิงกึ่งปริมาณ ในงานนี้อีกด้วย

ในงานวิจัยส่วนที่สาม เป็นการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์โปรตีน โดยใช้เทคนิคอินดักทีฟฟลิคซ์เฟลพลาสมา-แมสสเปกโตรเมตรี เพื่อช่วยในการระบุชนิดของโปรตีนที่มีธาตุซีลีเนียมเป็นองค์ประกอบในข้าว ที่เจริญเติบโตในดินที่มีธาตุซีลีเนียมสูง โปรตีนในข้าว ถูกแยกด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟริซิสแบบ 2 มิติ ตำแหน่งของโปรตีนที่มีธาตุซีลีเนียมเป็นองค์ประกอบในตัวอย่างข้าวที่แยกได้นั้น ถูกระบุได้คร่าวๆ บนเจล ซึ่งเป็นความสัมพันธ์ระหว่างวิธีไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงอิเล็กโตรโฟริซิสแบบ 1 มิติ (1D IEF) และวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลามิเดเจลอิเล็กโตรโฟริซิสแบบ 1 มิติ (1D SDS-PAGE) จากนั้น ทำการยืนยันตำแหน่งของโปรตีนบนเจล ด้วยการสร้างภาพไอโซโทปของธาตุซีลีเนียม โดยใช้เทคนิคอินดักทีฟฟลิคซ์เฟลพลาสมา-แมสสเปกโตรเมตรีแบบใช้แสงเลเซอร์ เมื่อได้ทำการย่อยโปรตีนแล้ว โปรตีนจะถูกระบุชนิด ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีฟิสิกส์ของเหลวประสิทธิภาพสูงชนิดความดันสูงแบบคาปิลลารี ร่วมกับการตรวจวัดแบบมวลคู่ ด้วยเทคนิคอินดักทีฟฟลิคซ์เฟลพลาสมา-แมสสเปกโตรเมตรีและอิเล็กโตรสเปรย์อิมมูโนแอสสเปกโตรเมตรี พบว่า ธาตุซีลีเนียมปรากฏในรูปของกรดอะมิโนซีลีโนเมทไทโอนีน (SeMet) และกรดอะมิโนซีลีโนซิสทีอีน (SeCys) อยู่ในกลุ่มของโปรตีนในข้าว ซึ่งประกอบไปด้วย โปรตีน 19 กิโลดัลตันไกลบูลิน, โปรตีนกรานูล-บาร์คัสตารซ์ซินเนส และกลุ่มของโปรตีนกลูตลีน-โทปซีดลโคเรจ อัตราส่วนการแทนที่ของธาตุซีลีเนียมในธาตุซัลเฟอร์พบว่าสามารถเกิดการแทนที่ในกรดอะมิโนซีลีโนเมทไทโอนีนได้มากกว่ากรดอะมิโนซีลีโนซิสทีอีน ประมาณ 2 เท่า