20 SEP 1999

LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

A NEW CHEMILUMINESCENT ASSAY FOR LINAMARIN

SUTARNTHIP RUENGPRAPAVUT

With compliments
of
บัณฑิตวิทยาลัย ม.มหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY (BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRAUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1999

TH
3965n
1999
c.2

ISBN 974-662-339-7
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

042912 c.2

3636777 SCBC/D : MAJOR :BIOCHEMISTRY ; Ph.D. (BIOCHEMISTRY)
KEY WORD : CHEMILUMINESCENCE / LINAMARIN / LINAMARASE / GLUCOSE OXIDASE / PEROXIDASE / LUMINOL / CASSAVA

SUTARNTHIP RUENGPRAPAVUT : A NEW CHEMILUMINESCENT ASSAY FOR LINAMARIN. THESIS ADVISORS: MONTRI CHULAVATNATOL, Ph.D., JISNUSON SVASTI, Ph.D., PICHIT TOSUKHOWONG, Ph.D., BHINYO PANIJPAN, Ph.D., UDOM CHANTHARAKSRI, Ph.D. 156 P. ISBN 974-662-339-7

A new chemiluminescent assay was developed for the quantitative determination of linamarin (2-β-D-glucopyranosyl-2-methylpropane nitrile), the predominant cyanogenic glucoside present in cassava. The assay involved hydrolysis of linamarin by a specific enzyme, linamarase (EC 3.2.1.21), releasing glucose which was then measured by using a chemiluminescent system, consisting of glucose oxidase (EC 1.1.3.4)-peroxidase (EC 1.11.1.7)-luminol. The light measured using a luminometer was proportional to linamarin in the range of 1-8 μM. This method was more sensitive than the conventional spectrophotometric method (alkaline picrate) because it can determine linamarin at levels as low as 50 pmole. There was good agreement between the results of spectrophotometric method and chemiluminescent method for determining linamarin content of cassava tissue extracts, with the exception of extracts of mature leaves, for which the two methods did not produce agreeing results. However, several agents were found to interfere with the new assay. Vanadate, Mg^{2+} and Cu^{2+} were inhibitory to the luminescence of the H_2O_2-peroxidase-luminol system used in the coupling reaction while EDTA or EGTA activated the system. In addition, Hg^{2+}, NEM, PCMBS which inhibited glucose oxidase and Tris ion which inhibited linamarase all interfered with the new assay. Selected sugars, namely glucosamine, galactose, sucrose, sorbitol, fructose and N-acetylglucosamine showed no effect on the chemiluminescence.

A preparation in the extract of mature leaves (called "factor X") was found to inhibit the chemiluminescence using either $K_3Fe(CN)_6$ or peroxidase. The inhibiting factor was negatively charged at pH 8.5 and had an absorbance at 280 nm but contained no detectable protein. Its molecular weight was low (less than 6,500) but it was non-dialyzable. It was heat labile and probably consisted of no less than 3 components.

Chemiluminescence can be detected by using photographic film detection. As little as 15 μM of H_2O_2 was detected in PVC microtiter plate using Kodak Tri-Xpan (ASA 400) or Kodak Ektachrome (ASA 100).

Copyright by Mahidol University

3636777 SCBC / D : สาขาวิชา : ชีวเคมี : ปร.ด. (ชีวเคมี)

สุธารทิพย์ เรืองประภาวุฒิ : วิธีการตรวจหาลินามารินแบบใหม่โดยใช้วิธีเคมิลูมิเนสเซนส์ (A NEW CHEMILUMINESCENT ASSAY FOR LINAMARIN). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ ; มนตรี จุฬาวัฒนทล, Ph.D., ม.ร.ว. ชิษณุสรร สวัสดิวัตน์, Ph.D., พิชิต โตสุโขวงศ์, Ph.D., ภิญโญ พานิชพันธ์, Ph.D., อุดม จันทรารักษ์ศรี, Ph.D. 156 หน้า. ISBN 974-662-339-7

เคมิลูมิเนสเซนส์เป็นวิธีการใหม่ที่ใช้ในการตรวจหาปริมาณลินามารินในมันสำปะหลัง โดยอาศัยหลักการที่ว่า เมื่อลินามารินถูกย่อยโดยเอ็นไซม์ลินามาเรสจะให้กลูโคสและอะซีโตนไซยาโนไฮดรินออกมา ซึ่งกลูโคสจะถูกออกซิไดส์โดยเอ็นไซม์กลูโคสออกซิเดสได้เป็นกลูโคนิกแอซิดและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับลูมินอล-เปอร์ออกซิเดสแล้วให้แสงที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยเครื่องลูมิโนมิเตอร์ ซึ่งปริมาณแสงที่ออกมาจะเป็นสัดส่วนกับปริมาณความเข้มข้นของลินามาริน โดยสามารถวัดได้ในช่วง 1-8 ไมโครโมลาร์ แสดงว่าวิธีการนี้จะมีความไวในการตรวจวัดมากกว่าวิธีปัจจุบันที่ใช้สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ พบว่า Vanadate, Mg^{2+} และ Cu^{2+} สามารถยับยั้งปริมาณแสง แต่ในสภาวะที่มี EDTA หรือ EGTA ปริมาณของแสงจะเพิ่มขึ้น นอกเหนือจากนั้น Hg^{2+}, NEM, PCMBS ซึ่งยับยั้งกลูโคสออกซิเดส และ Tris ซึ่งยับยั้งลินามาเรส จะมีผลขัดขวางวิธีการใหม่นี้ ในขณะที่ น้ำตาลบางตัวเช่น glucosamine, galactose, sucrose, sorbitol, fructose และ N-acetylglucosamine จะไม่มีผลต่อการเพิ่มหรือลดปริมาณของแสง

ปริมาณลินามารินในส่วนต่างๆของมันสำปะหลังวิเคราะห์โดยวิธีใหม่เปรียบเทียบกับวิธีสเปคโตรโฟโตมิเตอร์พบว่าทั้งสองวิธีให้ค่าออกมาใกล้เคียงกัน ยกเว้นในใบแก่ปริมาณของลินามารินที่หาโดยวิธีสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ จะให้ค่าออกมามากกว่าวิธีเคมิลูมิเนสเซนส์ แสดงว่ามีสารบางตัวในใบแก่ที่ขัดขวางการหาปริมาณลินามารินในวิธีใหม่นี้ โดยให้ชื่อสารนี้ว่า factor X ซึ่งพบว่ามีคุณสมบัติดังต่อไปนี้ สามารถยับยั้งวิธีเคมิลูมิเนสเซนส์ทั้งที่ใช้ เปอร์ออกซิเดส หรือ $K_3Fe(CN)_6$ เป็นตัว catalyst หรือ cooxidant มีประจุลบที่pH 8.5 สามารถดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แต่ไม่สามารถตรวจพบโปรตีน มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 6,500 แต่ไม่สามารถ dialyze ออกได้ ไม่ค่อยทนต่อความร้อน อาจจะประกอบไปด้วยสารอย่างน้อย 3 ตัว

วิธีเคมิลูมิเนสเซนส์ ยังสามารถตรวจวัดได้ด้วย photographic film พบว่าปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 15 ไมโครโมลาร์สามารถตรวจวัดได้ใน PVC ไมโครไตเตอร์เพลท โดยใช้ฟิล์ม Kodak Tri-Xpan (ASA 400) หรือ Kodak Ektachrome(ASA100)

Copyright by Mahidol University