



**INNOWACYJNA  
GOSPODARKA**  
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



**UNIA EUROPEJSKA**  
EUROPEJSKI FUNDUSZ  
ROZWOJU REGIONALNEGO



# Biotechnologia Molekularna dla Zdrowia

**b**mz

**Projekt PO IG, działanie 2.1.**

*Rozwój ośrodków o wysokim potencjale badawczym*



**INNOWACYJNA  
GOSPODARKA**  
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



**UNIA EUROPEJSKA**  
EUROPEJSKI FUNDUSZ  
ROZWOJU REGIONALNEGO



# Identyfikacja substancji pochodzenia roślinnego z użyciem detektora CORONA CAD

**Przemysław Malec**

Department of Plant Physiology and  
Biochemistry,  
Faculty of Biochemistry, Biophysics and  
Biotechnology,  
Jagiellonian University,  
Kraków, POLAND

## Detektor wyładowań koronowych w aerozolu Corona CAD (charged aerosol detector)



Urządzenie jest uniwersalnym detektorem do HPLC o wysokiej czułości. Specyficzna metoda detekcji pozwala na stosowanie go do różnorodnych aplikacji, ponieważ odpowiedź detektora nie zależy od budowy chemicznej rozdzielanych substancji, a sygnał, w bardzo szerokim zakresie, jest liniowo proporcjonalny do stężenia analitu w eluacie.



**Wyładowanie koronowe jest to wyładowanie elektryczne spowodowane przez jonizację gazu otaczającego przewodnik.**

Wyładowanie to pojawia się kiedy gradient potencjału przekracza pewną krytyczną wartość, ale warunki są niewystarczające do powstania łuku elektrycznego.

## Urządzenie przeznaczone jest do współpracy z dowolnym wysokociśnieniowym chromatografem ciekowym

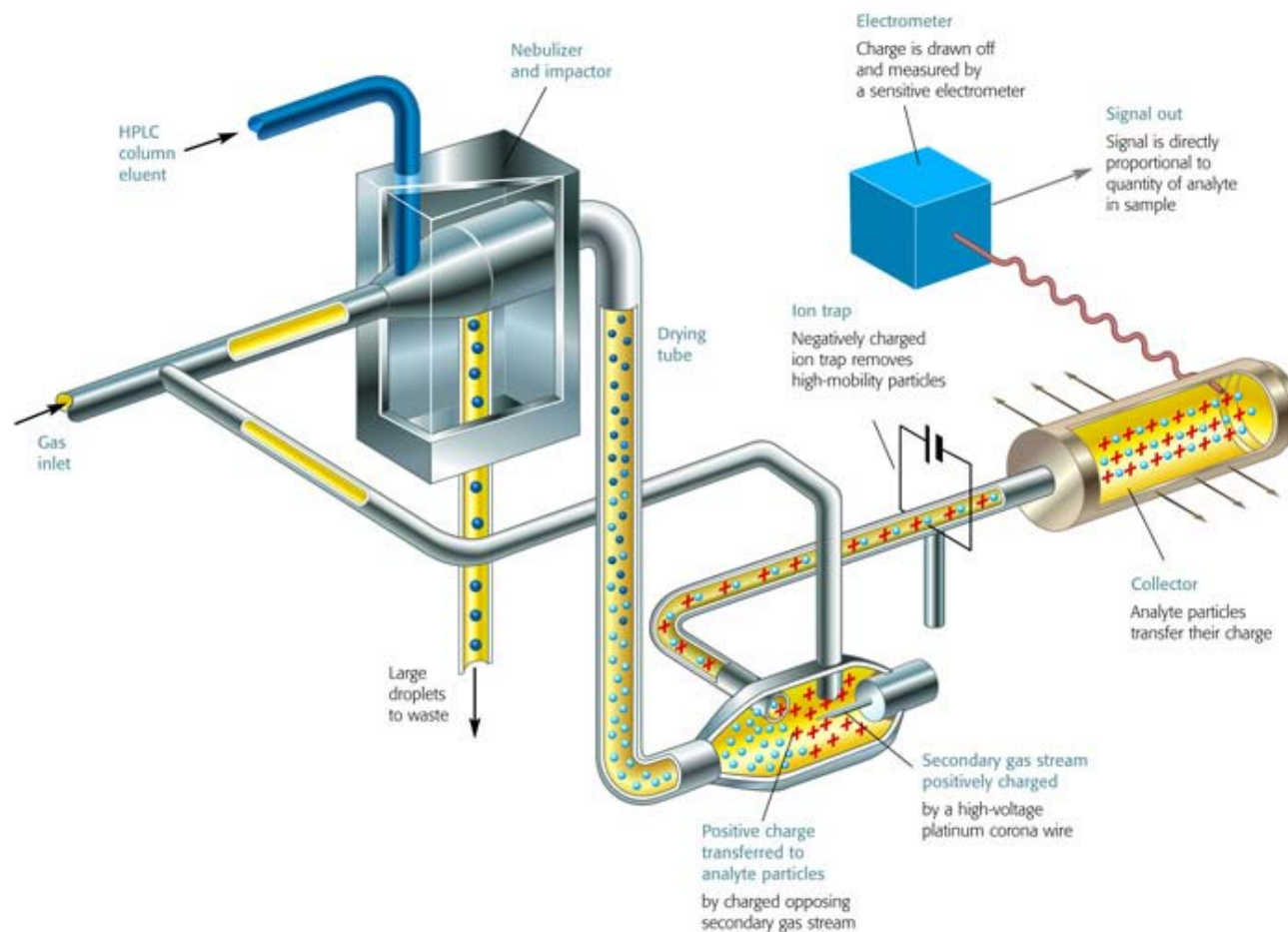




## Zasada działania

Wyływający z kolumny eluat poddawany jest ciśnieniowej nebulizacji (wytworzeniu aerozolu), oraz osuszaniu w strumieniu gazu obojętnego (azot). Wytworzony w ten sposób strumień cząsteczek analitu otrzymuje następnie ładunek dodatni, przenoszony przez płynący w przeciwnym kierunku drugi strumień gazu pozytywnie naładowany przez elektrodę koronową pod wysokim napięciem. Ładunek oddany przez cząsteczki jest mierzony przez elektrometr, a sygnał jest wprost proporcjonalny do **ilości** analitu w próbce.





<http://www.esainc.com>

Detektor wyładowań koronowych (lub naładowanego aerozolu) Corona CAD pozwala na wykrywanie substancji, dla których prężność par jest niższa od  $10^{-5}$  hPa, a jego odpowiedź nie zależy od ich budowy chemicznej.

W szczególności, detektor ten może być wykorzystany do jakościowej i ilościowej analizy substancji:

- nie wykazujących (bądź o słabej) aktywności optycznej w zakresie UV/Vis (lipidy, cukry, glikozydy, niektóre alkaloidy itp.),
- substancji występujących na ogół w niewielkich ilościach w próbkach pochodzenia biologicznego (np. prekursorzy ważnych metabolitów, fitohormony i in. substancje o charakterze sygnałowym).

**Zastosowania na stronie: <http://www.esainc.com>**



# Rozwój *Arabidopsis* kontrolowany jest przez światło



Zatrzymanie  
rozwoju

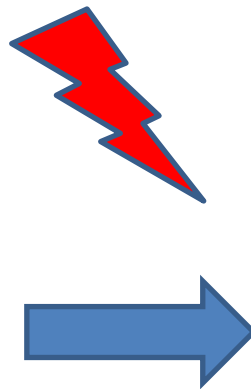
Światło  
(Fotomorfogeneza)

Ciemność  
(Skotomorfogeneza,  
Etiolacja)

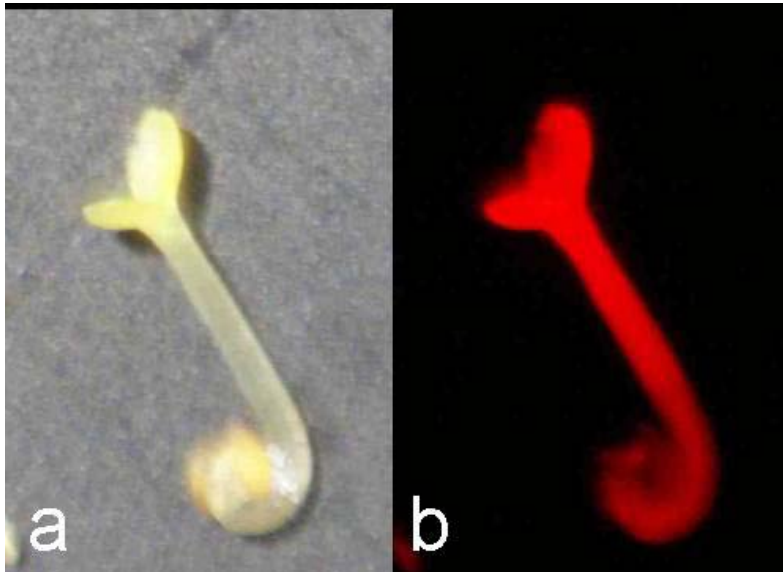


Deetiolacja – przejście do fotoautotrofii

**Cel:** poznanie roli, jaką pełnią komórki regulatory fotomorfogenezy roślin: białko COP1 i kompleks CSN w kontroli kluczowych etapów biosyntezy chlorofilu



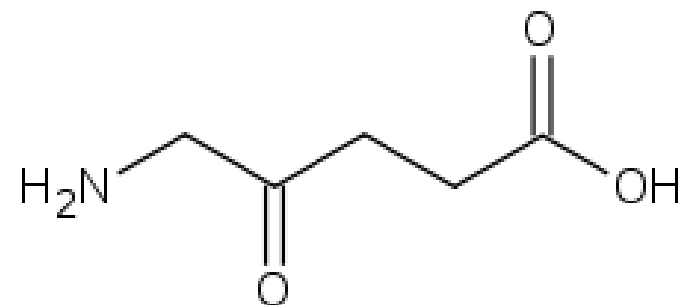
Projekt badawczy pt. „Rola białkowych regulatorów fotomorfogenezy roślin w kontroli procesu biosyntezy chlorofilu” obejmuje m.in. charakterystykę biochemiczną prekursorów chlorofilu w liniach mutantów *Arabidopsis* z *dysfunkcją białek regulatorowych fotomorfogenezy* (jak np. mutant *cop1*)



Rosnąca w ciemności (etiolowana) 5-dniowa siewka mutantu linii *cop1 Arabidopsis*: (a) zdjęcie w świetle dziennym; (b) czerwona fluorescencja uwidacznia nadmiarową akumulację prekursorów chlorofilu (protochlorofilid).

## Kwas 5-aminolewulinowy (ALA)

- aminokwas niebiałkowy



- kluczowy prekursor chlorofilu – jego stężenie w tkankach decyduje o szybkości biosyntezy chlorofilu podczas cyklu życiowego roślin

- brak grup chromoforowych

**Warunki rozdziału:**

Kolumna: C-18 , 4.6x250 mm, 5  $\mu$ m

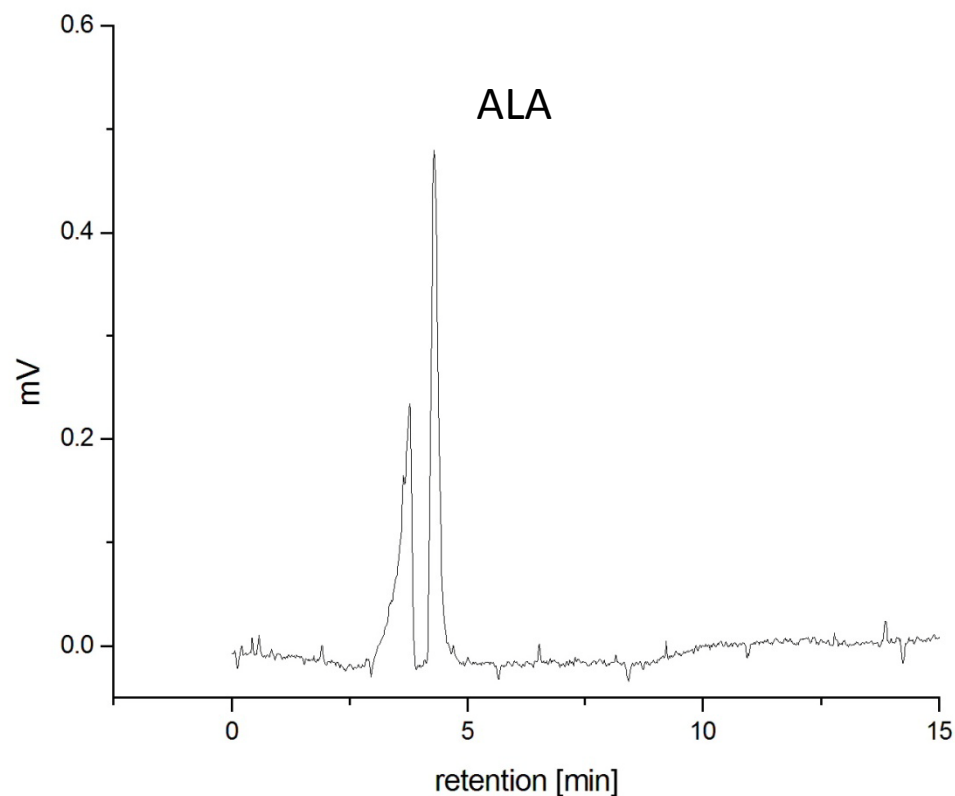
Przepływ : 0,6 ml/min

Obj. nastrzyku: 20  $\mu$ l

Solwent A: woda/2% (v/v) kwas octowy

Solwent B: 40% acetonitryl : 60%  
(woda/2% kw. octowy)

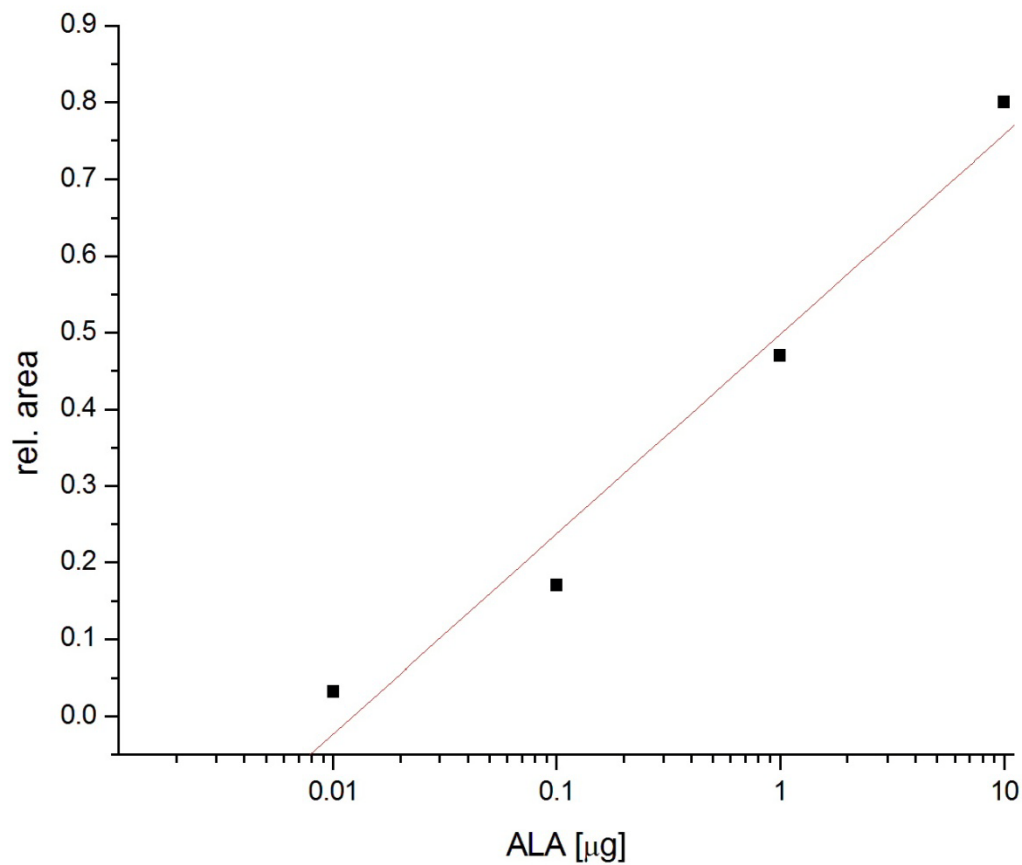
Detekcja: Corona CAD 100pA



**ALA – kalibracja:**  
**10 ng – 10 µg**

**R > 98%**

**SD < 5%**



## **Corona CAD charakteryzuje się:**

- wysoką czułością,
- szerokim zakresem pomiarowym (liniowość odpowiedzi)
- łatwością obsługi



## Ograniczenia:

- konieczność stosowania wzorców analizowanych substancji
- konieczność eliminowania substancji interferujących (przygotowanie próbki, dobór kolumn chromatograficznych)
- konieczność zapewnienia zewnętrznego źródła gazu (azot)
- względnie wysoka wrażliwość na zakłócenia elektryczne (!)