



Doctoral Thesis

Detektion von Neurotransmittern und Monosacchariden in der Kapillar-Zonen-Elektrophorese

Author(s):

Silvestri, Ivo

Publication Date:

1994

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001419974> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Detektion von Neurotransmittern
und Monosacchariden in der
Kapillar-Zonen-Elektrophorese

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von
Ivo Silvestri
Dipl. Chem. ETH
geboren am 3. Dezember 1964
von Eggersriet SG

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. E. Pretsch anstelle von
Prof. Dr. W. Simon[†], Referent
Prof. Dr. P. L. Luisi, Korreferent

Zürich 1994

1. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war einerseits, das Verhalten einer ionenselektiven Mikroelektrode als potentiometrischer Detektor in der Kapillar-Zonen-Elektrophorese (CZE) theoretisch zu beschreiben sowie früher erhaltene tiefe Nachweisgrenzen zu erklären. Andererseits sollte eine neue CZE-Detektionsmethode für Saccharide entwickelt werden, die auf deren Komplexierung mit Borsäuren basiert.

Bis heute wurde das potentiometrische Verhalten von ionenselektiven Elektroden mit Hilfe der Nikolsky-Eisenman-Gleichung beschrieben. Im ersten Teil dieser Arbeit konnte aber gezeigt werden, dass diese semiempirische Beziehung die Ansprechfunktion des Mikroelektroden-Detektors nur ungenügend erklärt. Deshalb wurde die Theorie erweitert, in dem man die Henderson-Gleichung für das Diffusionspotential sowie eine empirische Beziehung berücksichtigte, die den Einfluss des externen elektrischen Feldes auf das potentiometrische Detektorsignal beschreibt. Beide Faktoren müssen mit einbezogen werden, wenn die Aktivität der Analyt-Ionen mindestens ein Zehntel derjenigen der Hintergrundelektrolytionen beträgt und/oder wenn die spezifischen Leitfähigkeiten der elektrokinetisch injizierten Probe und des Hintergrundelektrolyten signifikant verschieden sind. Im letzteren Fall arbeitet die ionenselektive Elektrode auch als Leitfähigkeitsdetektor.

Für die Detektion von Aminen biologischen Ursprungs wurde die Zusammensetzung verschiedener Membranphasen optimiert. Mit dem resultierenden Sensor und dem Eigenbau-Instrument war es möglich, in Quarzkapillaren von 10 μm Innendurchmesser Histamin, Acetylcholin, Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin mit einer theoretischen Trennstufenzahl von bis zu 300'000 zu trennen.

Es konnte gezeigt werden, dass die früher gefundenen Nachweisgrenzen im Bereich von ca. 10^{-8} M für Alkali- und Erdalkalimetallionen sowie für einige organische Kationen nicht detektor-, sondern injektionsspezifisch sind und durch die wesentlich geringere spezifische Leitfähigkeit der Analytlösung im Vergleich zu derjenigen des Hintergrundelektrolyten hervorgerufen wurden. Beim Anlegen einer externen Spannung an die Kapillare entsteht ein

proportional grösseres elektrisches Feld in der Analytzone, auf Grund dessen die Probe aufkonzentriert wird. Es wurde gefunden, dass die Flächen der Signalbanden linear von der spezifischen Leitfähigkeit der Lösung abhängen. Modellrechnungen, die auf Transportzahlen basieren, ergaben eine gute Übereinstimmung mit den experimentellen Resultaten.

Im zweiten Teil der Arbeit werden drei verschiedene UV/Vis-Detektionsschemas in der CZE-Analyse von Sacchariden vorgeschlagen. Im ersten dient Phenylborsäure in gepufferter wässriger Lösung zur Komplexierung der Saccharide. Der Saccharid-Phenylborat-Komplex besitzt einen tieferen Extinktionskoeffizienten als Phenylborat. Die grösste Empfindlichkeit erzielt man, wenn die Differenz in der Extinktion bei 224 nm und pH 11.2 gemessen wird. Im zweiten Schema wird dem Phenylboratpuffer Thymolblau als pH-Indikator zugesetzt und die Erniedrigung des pH-Wertes infolge Bildung der Saccharid-Phenylborat-Komplexe bei 596 nm gemessen. Für das entsprechende System mit Glucose, Borsäure und Thymolblau wird ein mathematisches Modell der beteiligten Säure-Base- und 1:1- sowie 2:1-Glucose-Borat-Gleichgewichte vorgeschlagen und die Verschiebung des Indikatorgleichgewichts in Funktion des pH-Wertes und der Indikatorkonzentration berechnet. Dabei zeigt sich, dass die Nachweisgrenze nahezu linear mit der Indikatorkonzentration besser wird.

Im dritten Schema wird wiederum Phenylborsäure verwendet, aber mit einer wesentlich höheren Thymolblau-Konzentration. So liessen sich für Mannose und Fructose bei pH 9 ohne vorhergehende Derivatisierung zum ersten Mal Nachweisgrenzen von 500 fmol erreichen. Es wurden Trennungen von Zuckern mit einem Eigenbau- sowie mit einem kommerziellen CZE-Gerät durchgeführt.

2. Summary

The aim of this work was, on the one hand, to theoretically describe the electromotive response of an ion-selective microelectrode as a potentiometric detector in capillary zone electrophoresis (CZE) and to explain the previously reported low detection limits. On the other hand, a new CZE detection method for saccharides was to be developed on the basis of their complexation with boric acids.

Up to now, the electromotive behaviour of an ion-selective electrode has been described by the Nicolsky-Eisenman equation. In the first part of this work, it was shown, however, that this semi-empirical relation is not appropriate for explaining the response function of the microelectrode detector used. Therefore, the theory was extended taking into account the Henderson equation for the diffusion potential as well as an empirical relationship describing the influence of an external electric field on the detector signal. Both these factors must be considered when the activity of the analyte ions is at least one tenth of that of the running buffer ions and/or when the conductivities of electrokinetically injected samples and running buffer are significantly different. In the latter case, the ion-selective microelectrode also acts as a conductivity sensor.

The composition of different membrane phases was optimized for use in the electrophoretic detection of biological amines. With the resulting sensor and a laboratory-made instrument, it was possible to separate histamine, acetylcholine, dopamine, noradrenaline and adrenaline in fused-silica capillaries of 10 μm internal diameter with a theoretical plate number of up to 300,000.

It was shown that the previously reported detection limits of ca. 10^{-8} M for alkali and alkaline-earth metal ions as well as for some organic cations are not detector- but injection-specific. In fact, these low detection limits were due to the conductivity of the sample solution being significantly lower than that of the running buffer. When applying an external voltage to the capillary, a proportionally higher field will develop in the electrokinetically injected analyte zone causing the sample to become more concen-

trated. The peak areas were found to depend linearly on the specific conductance of the analyte solution. Model calculations based on transport numbers agreed well with the experimental results.

In the second part, three different UV/vis detection schemes are proposed for use in the CZE analysis of saccharides. In the first one, phenylborate in aqueous buffer was used as a complexing agent for saccharides, the saccharide-phenylborate complex exhibiting a lower extinction coefficient than the phenylborate itself. The highest sensitivity was obtained when measuring the difference in absorbance at 224 nm and pH 11.2. In the second scheme, thymol blue as pH indicator was added to the phenylborate buffer and the decrease in pH caused by the complexation of the saccharide was measured at a considerably higher wavelength (596 nm). A mathematical model of the acid-base and 1:1 as well as 2:1 glucose-borate complex equilibria involved in such a system with boric acid was developed and the shift in indicator equilibrium as a function of the pH and indicator concentration was calculated. It was found that the sensitivity increases almost linearly with the indicator concentration. In addition, it is also influenced by the pH of the running buffer.

In the third scheme, again a phenylborate buffer was used but with a much higher concentration of thymol blue. Thus, it was possible for the first time to achieve detection limits as low as 500 fmol for mannose and fructose at pH 9 without previous derivatisation. Separations of sugars were carried out with a laboratory-made and a commercial CZE instrument.