



Desarrollo y Optimización de un Método por CE-DAD para la Determinación de Neurotransmisores en Cerebros de Insectos y Vertebrados

Development and Optimization of a CE-DAD Method for the Determination of Neurotransmitters in Insect and Vertebrate Brains

Mariana Benavides-Vesga¹, Chiara Carazzone^{1*}

¹ Laboratorio de Técnicas Analíticas Avanzadas en Productos Naturales (LATNAP), Departamento de Química, Universidad de los Andes, Bogotá 111711, Colombia. * c.carazzone@uniandes.edu.co

Presentación Poster 22

ABSTRACT

This work presents advances in the development of a capillary electrophoresis method with UV detection (CE-DAD) for the identification and quantification of neurotransmitters in brain tissues from rats, fish, and insects of the *Rhodnius* genus ^[1;2]. The detection of these compounds in such matrices is typically challenged by the low-sensitivity limits and high complexity of the matrix ^[3;4]. Capillary Electrophoresis coupled to Diode Array Detection with extended light path represents an attractive alternative for such analytes, considering their chemical structure and low availability ^[5].

The analytical method was developed through a systematic evaluation of different background electrolytes (phosphates, tris, acetates) and instrumental parameters such as voltage, temperature, and capillary type. The final methodology employs a 25 mM phosphate buffer (H₃PO₄/NaH₂PO₄) at pH 2.5, with a running temperature of 30 °C, a positive voltage of 25 kV, and an extended light path capillary (56 cm effective length). This configuration enables efficient and reproducible separation and identification of compounds such as dopamine, tyrosine, and tryptophan in under 20 minutes. The possibility of including other neurotransmitters in the analysis is currently under investigation. Calibration curves were constructed for the available standards with good linearity, reaching detection and quantification limits of 100 ppb and 500 ppb of dopamine.

Regarding sample preparation, different extraction methods were tested (bead-assisted vortexing, ultrasound, and cryomaceration) using 0.1% formic acid. Although polar metabolites were successfully recovered, the significant presence of interfering compounds highlighted the need for more rigorous preparation and clean-up. Protocols like protein precipitation with acetonitrile and solid-phase extraction (SPE) were evaluated to remove unwanted compounds such as proteins, lipids, and degradation products commonly present in the final electropherogram.



This method represents a relevant technical advance; if fully developed, it would enable the identification and future quantification of neurotransmitters in complex biological matrices through an accessible, efficient technique with low instrumental requirements, without any derivatization process included.

Key words:

Capillary Electrophoresis, UV-DAD, Neurotransmitters, Brain tissue

RESUMEN

Este trabajo presenta avances en el desarrollo de un método de electroforesis capilar con detección UV (CE-DAD) para la identificación y cuantificación de neurotransmisores en tejidos cerebrales de ratas, peces e insectos del género *Rhodnius* ^[1;2]. La detección de estos compuestos en dichas matrices suele ser un desafío debido a los bajos niveles de concentración y a la alta complejidad de la muestra ^[3;4]. La electroforesis capilar acoplada a detección por arreglo de diodos (DAD) con capilar de trayectoria óptica extendida representa una alternativa atractiva para este tipo de analitos, considerando su estructura química y la limitada disponibilidad ^[5].

El método analítico se desarrolló mediante una evaluación sistemática de distintos electrolitos de fondo (fosfatos, tris, acetatos) y parámetros instrumentales como voltaje, temperatura y tipo de capilar. La metodología final utiliza un buffer de fosfato ($\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) a 25 mM y pH 2.5, una temperatura de corrida de 30 °C, un voltaje positivo de 25 kV, y un capilar de trayectoria óptica extendida (56 cm de longitud efectiva). Esta configuración permite la separación e identificación eficiente y reproducible de compuestos como dopamina, tirosina y triptófano en menos de 20 minutos. La posibilidad de incluir otros neurotransmisores en el análisis se encuentra actualmente en evaluación. Para los estándares disponibles, se construyeron curvas de calibración con buena linealidad, alcanzando límites de detección y cuantificación de 100 ppb y 500 ppb para la dopamina, respectivamente.

En cuanto a la preparación de muestras, se ensayaron diferentes métodos de extracción (vortex con perlas, ultrasonido y criomaceración), utilizando ácido fórmico al 0.1%. Aunque se logró recuperar metabolitos polares, la presencia significativa de compuestos interferentes evidenció la necesidad de una preparación y limpieza más rigurosas. Se evaluaron protocolos como la precipitación de proteínas con acetonitrilo y la extracción en fase sólida (SPE) para eliminar compuestos no deseados como proteínas, lípidos y productos de degradación presentes comúnmente en el electroferograma final.

Este método representa un avance técnico relevante; de consolidarse, permitiría la identificación y futura cuantificación de neurotransmisores en matrices biológicas complejas mediante una técnica accesible, eficiente y con bajos requerimientos instrumentales, sin necesidad de procesos de derivatización.

Palabras clave:

Electroforesis Capilar, DAD, Neurotransmisores, Tejido Cerebral



Agradecimientos/Acknowledgements

Agradezco al grupo de investigación Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical (CIMPAT) de la Universidad de los Andes, Departamento de Biología, bajo la dirección del profesor Jorge Molina, por su valioso aporte en este proyecto. En particular, al estudiante de doctorado Steeven Flores, quien ha facilitado la obtención de los cerebros de insectos del género *Rhodnius* y de peces utilizados en este estudio.

También extendo mi agradecimiento al grupo de investigación en Bioquímica Aplicada (GIBA), dirigido por la profesora Elizabeth Jiménez, y al estudiante de maestría Julián Corredor, con quien he trabajado estrechamente y fue el que proporcionó las muestras de cerebros de rata. Su colaboración ha sido fundamental para el desarrollo de este proyecto.

I would like to thank the research group *Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical* (CIMPAT) at Universidad de los Andes, Department of Biology, under the direction of Professor Jorge Molina, for their valuable contribution to this project. In particular, I am grateful to PhD student Steeven Flores, who facilitated the acquisition of brain samples from *Rhodnius* insects and fish used in this study.

I also extend my sincere appreciation to the *Applied Biochemistry Research Group* (GIBA), led by Professor Elizabeth Jiménez, and to Master's student Julián Corredor, with whom I worked closely and who provided the rat brain samples. Their collaboration has been essential to the development of this project.

Referencias/References

- [1] DENNO, M. E., *et al.* (2015). Analysis of Neurotransmitter Tissue Content of *Drosophila Melanogaster* in Different Life Stages. *ACS Chemical Neuroscience* **6**(1): 117-123. [DOI]
- [2] SHIN, M., *et al.* (2020). Measurement of Natural Variation of Neurotransmitter Tissue Content in Red Harvester Ant Brains among Different Colonies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **412**(24): 6167-6175. [DOI]
- [3] PHAN, N. T. N., *et al.* (2013). Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry–Based Detection of Drugs and Neurotransmitters in *Drosophila* Brain. *Analytical Chemistry* **85**(17): 8448-8454. [DOI]
- [4] MIEKUS, N., *et al.* Comparison of Three Extraction Approaches for the Isolation of Neurotransmitters from Rat Brain Samples. *International Journal of Molecular Sciences*. (2018). [DOI]
- [5] WEBER, P. L., *et al.* (1994). Separation and Quantitation of the Amino Acid Neurotransmitters in Rat Brain by Capillary Electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **12**(3): 319-324. [DOI]