

ラット・マウスの脳微小透析液中 5-ヒドロキシインドール及びカテコールアミン類の HPLC 蛍光分析法の開発とその脳機能研究への実用

藤野 薫

財団法人 化学物質評価研究機構, 877-0061 大分県日田市石井町 3-822

Determination of 5-hydroxyindoles and catecholamines in microdialysis samples from rat and mouse brain by high performance liquid chromatography with fluorescence detection and its practical application to research on the brain functions

Kaoru Fujino

Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan, Ishii-machi 3-822, Hita 877-0061, Japan.

Abstract

Serotonin (5HT), norepinephrine (NE) and dopamine (DA) are important neurotransmitters, which are involved in control and regulation of numerous functions of the central and peripheral nervous systems. Monitoring the levels of monoamines and their deaminated metabolites in body fluids and tissue biopsies is important in basic research on the brain functions and diseases investigations. In this study, a sensitive microbore-column liquid chromatographic methods for the single and/or simultaneous determination of fluorescent derivatives of 5-HT, NE, DA and their metabolites in tissue and microdialysis samples from rat and/or mouse brain are described. The method is based on precolumn derivatization of the 5-hydroxyindoles (5-HIs) with benzylamine and catecholamines (CAs) with 1,2-diphenylethylenediamine (DPE) in a weakly alkalic medium and in the presence of potassium hexacyanoferrate (III) and organic solvent resulting in the corresponding highly fluorescent and stable benzoxazole derivatives. The detection limits for NE, 5-HT, DA and their major metabolites were in the attomole range. These methods permit the highly sensitive, selective and simple single and/or simultaneous determination of 5-HIs and CAs. These methods should be useful for research on the brain functions and many diseases investigations.

Key Words: 5-hydroxyindoles, catecholamines, derivatization, HPLC, microdialysis

緒言

近年の高ストレス化、高齢化などの社会現象に伴い、うつ病¹⁾³⁾、パーキンソン病⁴⁾などの精神及び神経疾患が深刻な問題となっている。これらの疾患には、5-ヒドロキシインドール類(5-HIs)[セロトニン(5-HT)など]やカテコールアミン類(CAs)[ノルエピネフリン(NE)、ドパミン(DA)など]が深く関与していることが知られている。これらの生理活性アミン類を生合成するニューロン(神経細胞)は脳内の特定の部位に局在し、その神経系は脳の広範囲に投射している⁵⁾⁷⁾。投射部位における多様な機能は上記の種々の精神及び神経疾患と密接に関係している。従って、脳機能及び精神・神経疾患解明研究には、脳内の限局部位における5-HIsやCAsの分子レベルでの*in vivo*モニタリング(動態)解析が必須である。近年、ラットやマウスなどの小実験動物を用いて研究が進められている。

現在、ラットやマウスの脳内*in vivo*モニタリング解析の手法には、Ungerstedt⁸⁾らにより開発された微小透析(マイクロダイアリシス)法が主に用いられている(Fig. 1)。微小透析法により脳の各部位から回収された5-HIs及びCAsの計測には、簡便かつ比較的高感度であることからHPLC/ECD法が使用されてきた⁹⁾¹⁹⁾。しかし、HPLC/ECD法は、感度、選択性、精度、装置の耐久性などの点で満足な分析法とは言えない。さらに、5-HIsとCAsの高感度同時定量は不可能である。本研究で、これらのアミン類の単独定量及び同時定量法を開発した。さらに、本法を脳機能に関わるいくつかの研究に実用し、本法の有用性を実証した。

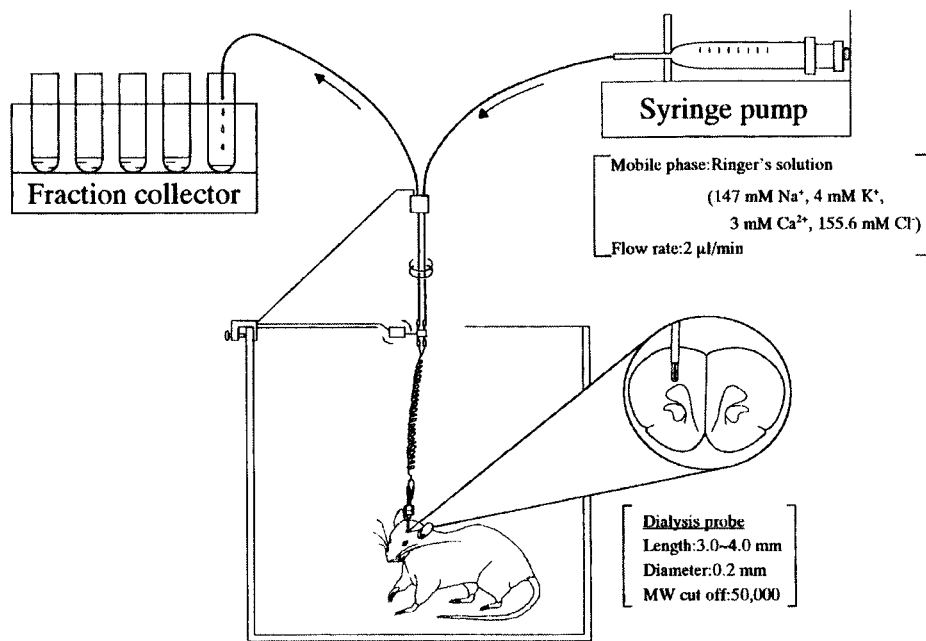


Fig. 1 Microdialysis system

本法の原理は、脳から回収された微小透析液中の 5-HIs 及び CAs が、弱アルカリ性、ヘキサシアノ鉄(III)酸カリウム存在下で、ベンジルアミンあるいは 1,2-ジフェニルエチレンジアミン(DPE)とそれぞれ選択的に反応し、生じた強蛍光性のオキサゾール誘導体(Fig. 2)を HPLC 分離後、蛍光検出することに基づいている²⁰⁾⁻²³⁾。

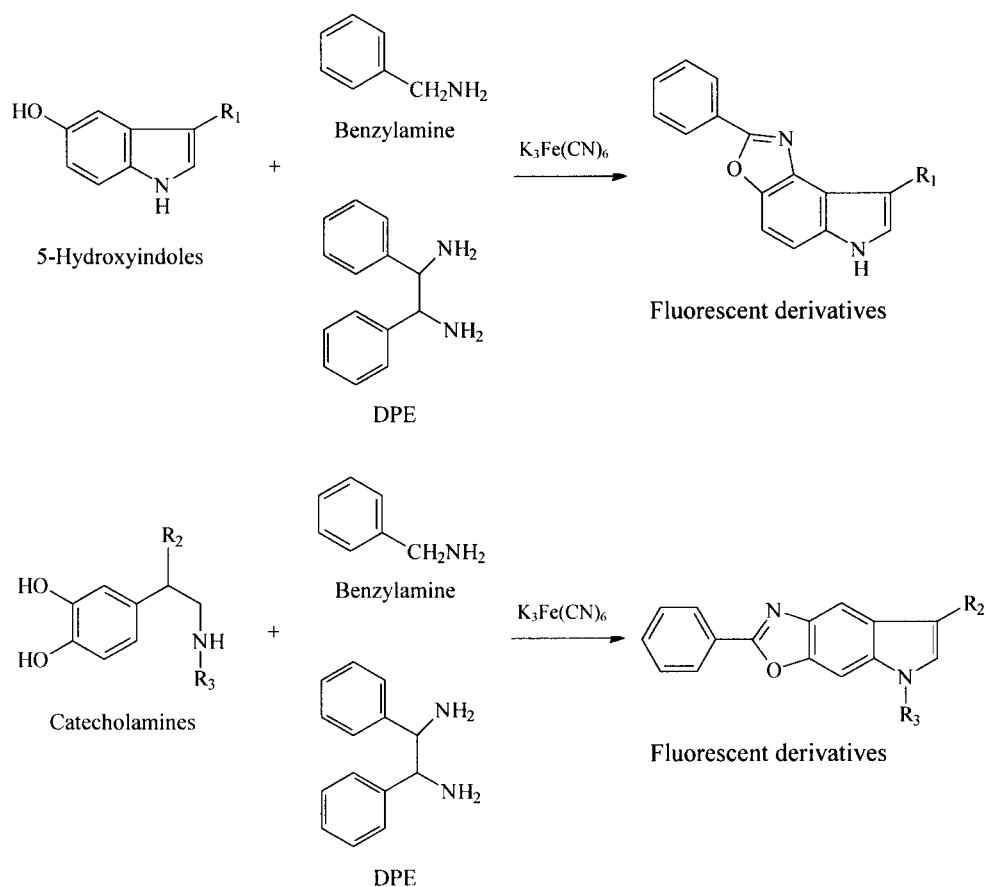


Fig. 2 Derivatization reaction scheme of 5-hydroxyindoles and catecholamines with benzylamine and DPE in the presence of potassium hexacyanoferrate (III).

Microbore HPLC 蛍光検出によるラット及びマウス脳微小透析液中セロトニンの高感度測定法の開発

はじめに、5-HT の高選択的計測法の開発を目的とした。ベンジルアミンによる 5-HT の選択的蛍光誘導体化及び HPLC 条件について検討し、この高感度・高選択的 HPLC 蛍光検出法を確立した(Chart 1)。本法により 5-HT は 5-10 分以内に分離検出され、その検出限度(S/N=3)は注入量あたり 75 amol と高感度であった。これにより、ラット海馬、線条体及び前頭葉中 5-HT の短周期(3-5 分間)における 5-HT 動態計測が初めて可能になった。高カリウム灌流液刺激やメタンフェタミンの腹腔内投与時における海馬での細胞外 5-HT 量の経時的变化を測定し、本法の有用性を確認した²⁴⁾(Fig. 3)。

Chart 1 Procedure for the fluorescence derivatization of serotonin with benzylamine

Microdialysate sample	10 μ L
Reagent solution	10 μ L
0.3 M CAPS buffer (pH 12.0)	5 vol
0.2 M Benzylamine	9 vol
0.1 M $K_3Fe(CN)_6$	3 vol
MeOH	3 vol
Stand, room temp., 2 min	
Apply onto HPLC (5 μ L)	
HPLC conditions	
Column: TSK gel ODS-80TM (100x1.0 mm.i.d.)	
Mobile phase: CH_3CN -40 mM phosphate buffer (pH 7.5) [57:43, v/v] containing 1 mM EDTA \cdot 2Na	
Flow rate: 50 μ L/min	
Fluorescence detection: Ex.345 nm Em.480 nm	

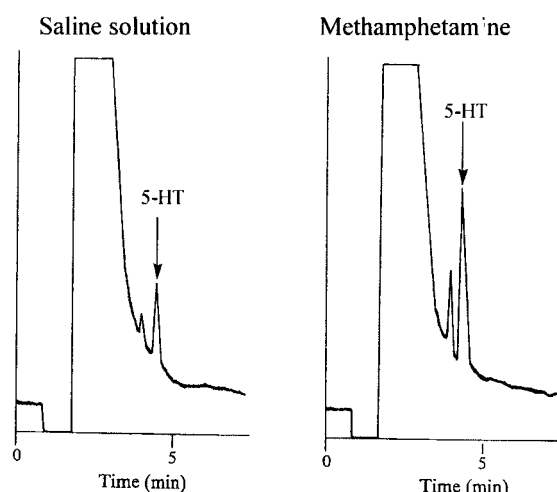


Fig. 3 Chromatograms obtained with the hippocampus dialysates of rat, which was administrated intraperitoneally with saline solution or methamphetamine (3 mg/kg).

精神・神経研究、抗うつ薬の薬効評価及び作用機序の解明などに、ラットが多く用いられてきた。一方、ノックアウトやトランスジェニックマウス作製などにより、近年、マウスを用いる研究が主流となりつつあり、マウス脳 5-HT の計測が極めて重要となっている^{25), 26)}。しかし、ラットに比べてマウス脳内 5-HT が微量であるなどの理由で、マウスを用いる研究は極めて困難であった。先に開発した 5-HT 分析法²⁴⁾の改良を行い、微小透析法によるマウス海馬及び前頭葉中 5-HT の高感度・高選択的かつ短周期(3 分間)的定量法を確立した。さらに、本法を種々のストレス(Tail pinch、Handling、強制水泳)負荷条件下におけるマウス脳内 5-HT の動態変化の測定に応用した²⁷⁾(Fig. 4)。

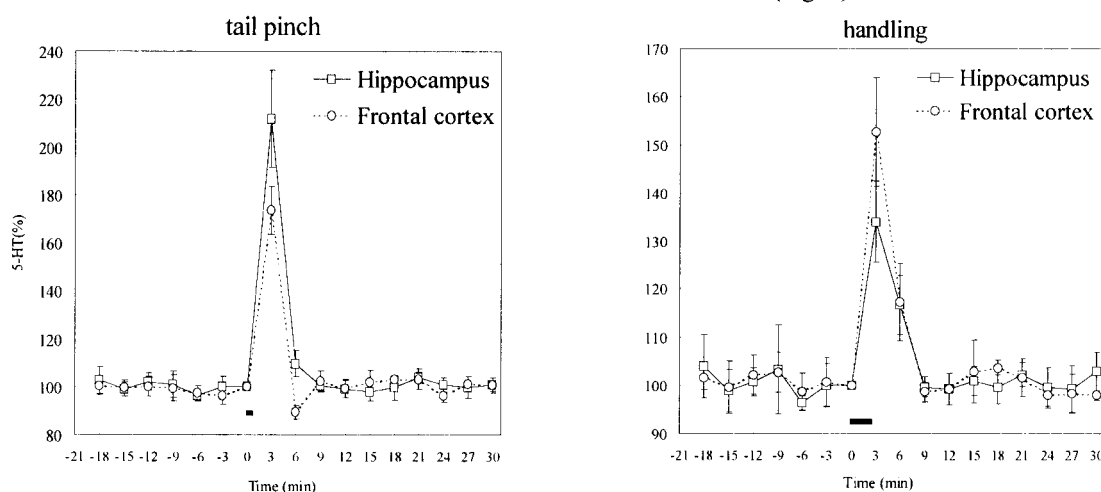


Fig. 4 Effects of tail pinch (5 s) and handling (3 min) on extracellular levels of 5-HT in the mouse frontal cortex and hippocampus (n=3 in each test).

Microbore HPLC 蛍光検出によるラット脳微小透析液中ノルエピネフリンの高感度測定法の開発

次に、NE の選択的計測を目的とした。ベンジルアミンによる NE の選択的蛍光誘導体化及び HPLC 条件について検討し、この高感度・高選択的 HPLC 蛍光検出法を確立した(Chart 2)。本法により NE は 10 分以内に分離検出され、その検出限度(S/N=3)は注入量あたり 90 amol と極めて高感度であった。本法により、ラット海馬、前頭葉及び視床下部中 NE の高感度・高選択的かつ短周期(5 分間)的定量が可能になった。高カリウム灌流液刺激及び抗うつ薬(アミトリプチリン、マプロチリン)やアドレナリン作用性遮断薬(レセルピン)投与時における、海馬中 NE の短周期的な動態変化を測定し、本法の有用性を確認した²⁸⁾(Fig. 5, 6)。

Chart 2 Procedure for the fluorescence derivatization of norepinephrine with benzylamine

Microdialysate sample	10 μ L
Reagent solution	10 μ L
0.45 M CAPS buffer (pH 12.0)	7 vol
0.2 M Benzylamine	9 vol
0.01 M $K_3Fe(CN)_6$	1 vol
<i>N,N</i> -Dimethylformamide	3 vol
Stand, 50°C 20min	
Apply onto HPLC (10 μ L)	

HPLC conditions

Column: L-Column (150x1.0 mm.i.d.)
Mobile phase: CH_3CN -Britton-Robinson buffer (pH 7.5)
[34:66, v/v] containing 1 mM
didodecyltrimethylammonium bromide
Flow rate: 40 μ L/min
Fluorescence detection: Ex. 345 nm
Em. 480 nm

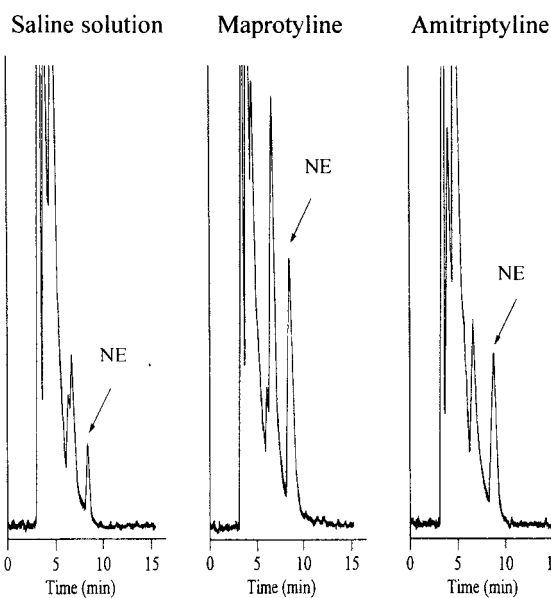


Fig. 5 Chromatograms obtained with the frontal cortex dialysates of rat brain, which was administrated with saline solution (orally), maprotyline (orally, 10 mg/kg) or amitriptyline (subcutaneously, 10 mg/kg).

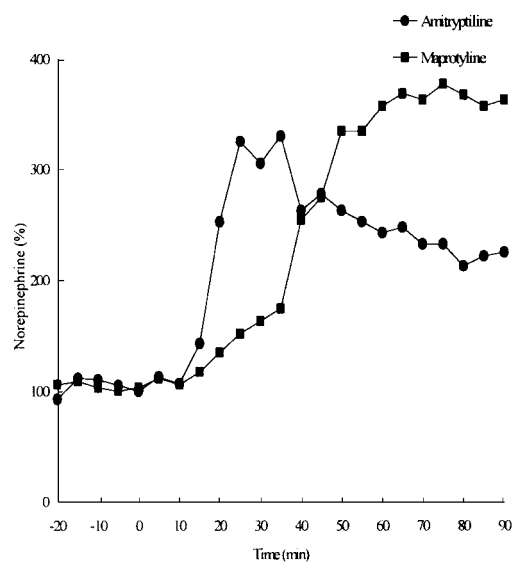


Fig. 6 Effect of maprotyline and amitriptyline on NE level in the frontal cortex.

Microbore HPLC 蛍光検出によるラット脳微小透析液中セロトニン及びノルエピネフリンの高感度同時測定法の開発

多くの精神・神経疾患や脳機能は複数の神経伝達物質が相互に関係していることが知られており、その作用機序解明や新規薬剤の評価などにおいては、これら伝達物質の関係を明らかにすることが重要である。そこで、NE、5-HT 及びその代謝物である 5-ヒドロキシインドール-3-酢酸(5-HIAA)の同時定量法の開発を行った(Chart 3)。本法は、5-HIs 及び NE がベンジルアミンと同時に誘導体化する条件を選択し、蛍光生成物を HPLC で分離・検出することに基づいている。検出限度は、注入量あたり数百 amol レベルであった。ラット海馬及び前頭葉中 5-HT、NE 及び 5-HIAA の高感度・高選択な同時的定量を可能とし、高カリウム、無カルシウム灌流液、抗うつ薬(イミプラミン、デシプラミン)投与による 5-HT 及び NE の動態変化の測定に応用した²⁹⁾(Fig. 7, 8)。

Chart 3 Procedure for the fluorescence derivatization of serotonin and norepinephrine with benzylamine

		HPLC conditions
Microdialysate sample	15 μ L	Column: TSK gel ODS-80TM (100x1.0 mm.i.d.) Mobile phase: CH ₃ CN-15 mM acetate buffer (pH 5.0) [31:69, v/v] containing 1 mM EDTA·2Na Flow rate: 50 μ L/min Fluorescence detection: Ex.345 nm Em.480 nm
Reagent solution	15 μ L	
0.3 M CAPS buffer (pH 12.0)	5 vol	
0.5 M Benzylamine	9 vol	
0.01 M K ₃ Fe(CN) ₆	3 vol	
MeOH	3 vol	
Stand, 50°C, 20 min		
Apply onto HPLC (20 μ L)		

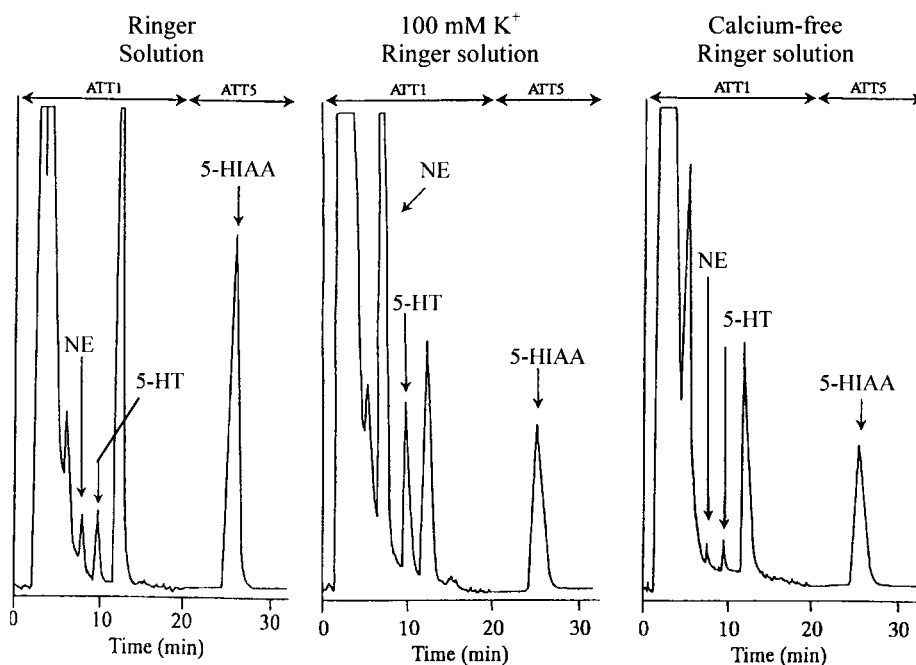


Fig. 7 Chromatograms of the microdialysis samples from rat hippocampus at Ringer solution, 100 mM K⁺ Ringer solution and calcium-free Ringer solution.

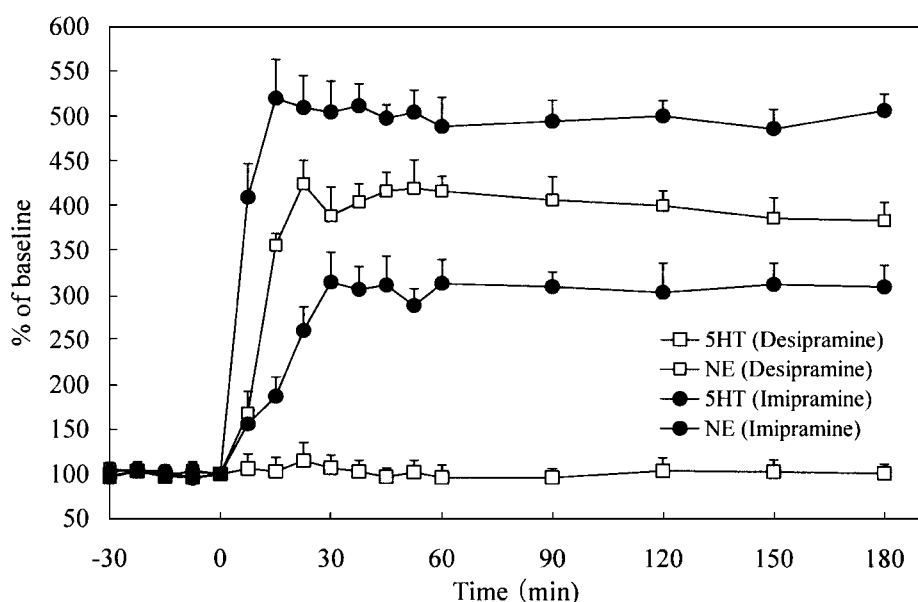


Fig. 8 Effects of desipramine (10 mg/kg i.p.) and imipramine (10 mg/kg i.p.) on 5-HT and NE levels in the frontal cortex dialysates.

ベンジルアミン及びDPEを用いるHPLC蛍光検出によるラット脳及び脳微小透析液中セロトニン、ノルエピネフリン、ドパミン及び関連代謝物の高感度同時測定法の開発

最後に、これまでのベンジルアミンのみを用いる計測法で測定困難であった DA を含む 5-HIs 及び CAs 関連物質の一斉分析法の確立を目的とした。DPE が DA を含む CAs と反応し、ベンジルアミンの場合と同一の強蛍光性ベンゾキサゾール誘導体を形成することに着目し、両試薬の併用にに基づく高感度一斉分析法を確立した(Chart 4)。本法により標準溶液から得られたクロマトグラムを Fig. 9 に示す。検出限度は、DOMA を除く化合物について、数百 amol レベルであり、従来法に較べ極めて高感度であった³⁰⁾(Table 1)。

Chart 4 Procedure for the fluorescence derivatization of 5-hydroxyindoles and catechols with benzylamine and DPE

Microdialysate sample	20 µL
Reagent solution 1	20 µL
0.3 M CAPS buffer (pH 10.0)	2 vol
0.3 M Benzylamine	6 vol
0.02 M K ₃ Fe(CN) ₆	3 vol
MeOH	24 vol
Stand, room temp., 2 min	
Reagent solution 2	12 µL
0.3 M Glycine	1 vol
0.1 M DPE	2 vol
Stand, 50°C, 20 min	

↓
Apply onto HPLC (20 µL)

HPLC conditions

Column:L-Column (150x1.5 mm.i.d.)
 Mobile phase: CH₃CN-acetate buffer (pH 4.5)
 [34:66, v/v] containing 1 mM
 1-octanesulfonic acid sodium salt
 Flow rate:100 µL/min
 Fluorescence detection:Ex.345 nm
 Em.480 nm

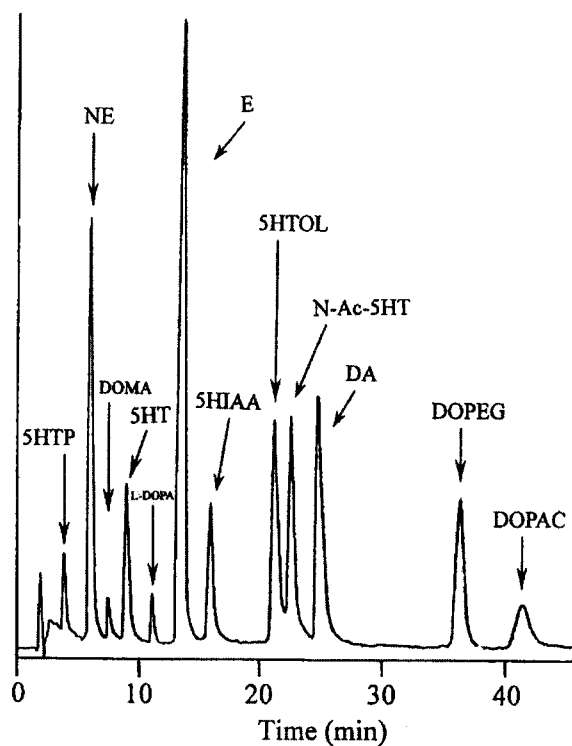


Fig. 9 Chromatogram of a standard solution of 5-hydroxyindoles and catecholamines. Peaks: 5-Hydroxytryptophan (5-HTP, 50 fmol); NE (50 fmol); 3,4-Dihydroxymanderic acid (DOMA, 5 pmol); 5-HT (50 fmol); L-DOPA (500 fmol); Epinephrine (E, 50 fmol); 5-HIAA (50 fmol); 5-Hydroxytryptophol (5-HTOL, 50 fmol); N-Acetyl-serotonin (N-Ac-5-HT, 50 fmol); DA (50 fmol); 3,4-Dihydroxyphenylglycol (DOPEG, 50 fmol); 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC, 50 fmol).

Table 1 Retention times and detection limits of 5-hydroxyindoles and catecholamines

Compound	Retention time (min)	Detection limit (fmol)
5-HTP	4.7	0.40
NE	6.1	0.08
DOMA	7.5	86.8
5-HT	9.9	0.20
L-DOPA	11.3	5.65
E	14.6	0.05
5HIAA	16.7	0.24
5-HTOL	21.9	0.15
N-Ac-5-HT	23.1	0.15
DA	26.0	0.13
DOPEG	37.5	0.23
DOPAC	41.2	0.68

先ず、本法をラット線条体ホモジナイズに適用するとともに、クロルジリン(モノアミン酸化酵素阻害薬)投与による影響を測定した(Fig. 10)。さらに、微小透析法によるラット線条体中 5-HIs 及び CAs の高感度・高選択な一斉分析を試み、フェネルジン(モノアミン酸化酵素阻害薬)投与による 5-HIs 及び CAs の動態変化の測定に成功した(Fig. 11)。

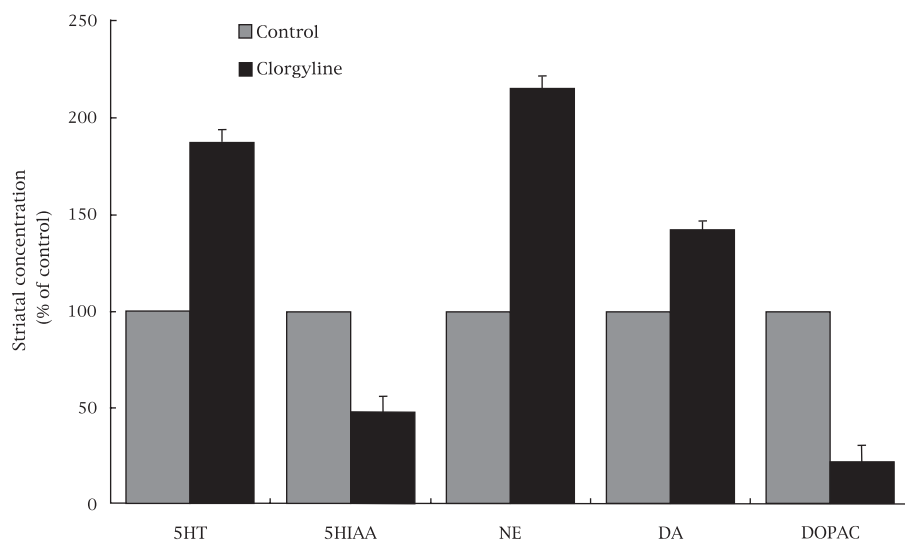


Fig. 10 Effect of clorgyline on 5HT, 5HIAA, NE, DA and DOPAC levels in the rat striatum tissue. Clorgyline (4 mg/kg) was intraperitoneally injected.

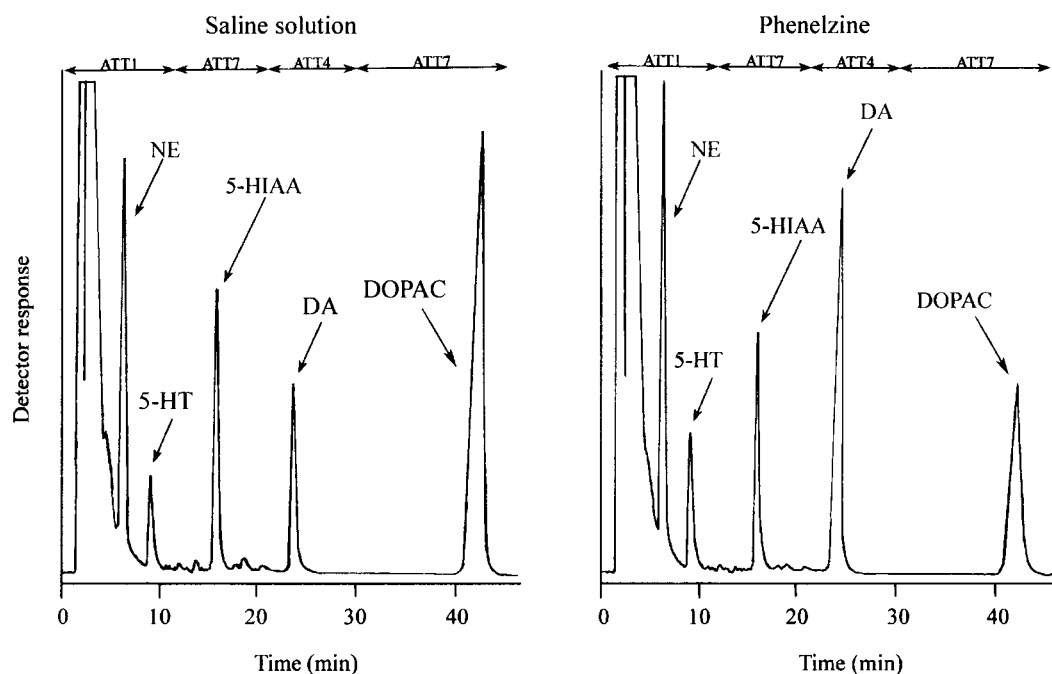


Fig. 11 Chromatograms of the microdialysis samples from rat from rat striatum, which was administrated intraperitoneally with saline solution and phenelzine (5 mg/kg).

結 論

近年、臨床・薬理研究において高感度(分子レベルでの計測が可能)な動的分析法の開発が強く求められている。一方、HPLC蛍光検出法は、超高感度分析法であることは周知の事実である。しかし、HPLCを先の動的分析法に適用することは極めて困難であると言われてきた。この主な原因は、前処理を行うことなく、目的の生体物質のみを蛍光誘導体化することが不可能であったことによる。本研究で用いたベンジルアミンやDPEは、生理活性アミンである5HIs及びCAsのみと反応する極めて優れた試薬(ピンポイントターゲティング試薬)である。さらに、超高感度試薬であるため、これらの試薬を使用することにより、短周期で得られた微小透析サンプル中のアミン類の動的分析が始めて可能となった。これら試薬を単独で使用あるいは併用することにより、ラットやマウス脳微小透析液中の5-HIs及びCAsの高感度かつ高選択的な(単一または一斉)分析法を種々開発することができた。これらの分析法の中から、研究の目的や解明すべき生理活性アミン類に対応して、適当な分析法を適宜選択することにより効果的な研究が実施できるであろう。種々の薬剤の薬効評価や新薬開発、脳神経機能の解明などにおいて極めて有用で、臨床研究や脳神経研究への一助になることが大いに期待される。

謝辞

本研究は、福岡大学薬学部薬品分析学教室山口政俊教授の終始変わらざる暖かい御指導と御鞭撻のもとに行われました。謹んで感謝の意を表します。数々の御助言を賜り、討論に御参加頂きました福岡大学薬学部薬品分析学教室の皆様へ深謝致します。また、本研究の実施にあたり多大なる御理解と御協力を賜りました財団法人 化学物質評価研究機構の皆様へ深謝致します。

参考文献

- 1) Boyer, P.: Do anxiety and depression have a common pathophysiological mechanism? *Acta Psychiatr Scand.* 406: 24-29 (2000)
- 2) Guo, W.Y., Todd, K.G., Bourin, M. & Hascoet, M.: The additive effects of quinine on antidepressant drugs in the forced swimming test in mice. *Psychopharmacology* 121: 173-179 (1995)
- 3) Jobe, P.C., Dailey, J.W. & Wernicke, J.F.: A noradrenergic and serotonergic hypothesis of the linkage between epilepsy and affective disorders. *Crit. Rev. Neurobiol.* 13: 317-356 (1999)
- 4) Oertel, W.H. & Quinn, N.P.: Parkinsonism. Brandt, T., Diener, H.C., Caplan, L.R., Kennard, C., Dichgans, J. (ed.): *Neurological Disorders: Course and Treatment*, Academic Press, San Diego, pp.715-772 (1996)
- 5) Fuxe, K., & Jonsson, G.: Further mapping of central 5-hydroxytryptamine neurons: studies with the neurotoxic dihydroxytryptamines. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 10: 1-12 (1974).

- 6) Anden, N.E., Dahlstrom, A., Fuxe, K., Olson, L. & Ungerstedt, U.: Ascending noradrenaline neurons from the pons and the medulla oblongata. *Experientia*, 22: 44-45 (1966).
- 7) Ungerstedt, U.: Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta. Physiol. Scand. Suppl.*, 367: 1-48 (1972).
- 8) Ungerstedt U.: Measurement of neurotransmitter release by intracranial dialysis. C.A. Marsden (ed.): *Measurement of neurotransmitter release in vivo. Methods in neurosciences*, vol. 6, J Wiley & Sons, pp. 81-105 (1984)
- 9) Cui, M., Feng, Y., McAdoo, D.J. & Willis, W.D.: Periaqueductal gray stimulation-induced inhibition of nociceptive dorsal horn neurons in rats is associated with the release of norepinephrine, serotonin, and amino acids. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289: 868-876 (1999)
- 10) Suwabe, A., Kubota, M., Niwa, M., Kobayashi, K. & Kanba, S.: Effect of a 5-HT_{1A} receptor agonist, flesinoxan, on the extracellular noradrenaline level in the hippocampus and on the locomotor activity of rats. *Brain Res.* 858: 393-401 (2000).
- 11) Vahabzadeh, A. & Fillenz, M.: Comparison of stress-induced changes in noradrenergic and serotonergic neurons in the rat hippocampus using microdialysis. *Eur. J. Neurosci.* 6, 1205-1212 (1994)
- 12) Wikell, C., Bergqvist, P.B., Hjorth, S., Apelqvist, G., Bjork, H. & Bengtsson, F.: Brain monoamine output alterations after a single venlafaxine challenge in experimental hepatic encephalopathy. *Clin. Neuropharmacol.* 21: 296-306 (1998)
- 13) Men, D., Matsui, A. & Matsui, Y.: Somatosensory afferent inputs release 5-HT and NA from the spinal cord. *Neurochem. Res.* 21: 1515-1519 (1997)
- 14) Yoshioka, M., Matsumoto, M., Togashi, H., Smith, C.B. & Saito, H.: Opioid receptor regulation of 5-hydroxytryptamine release from the rat hippocampus measured by in vivo microdialysis. *Brain Res.* 613: 74-79 (1993)
- 15) Sarre, S., Michotte, Y.; Marvin, C. A. & Ebinger, G.: Microbore liquid chromatography with dual electrochemical detection for the determination of serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid in rat brain dialysates. *J. Chromatogr.* 582: 29-39 (1993)
- 16) Yamazaki, T., Akiyama, T., Kitagawa, H., Takauchi, Y. & Kawada, T.: Elevation of either axoplasmic norepinephrine or sodium level induced release of norepinephrine from cardiac sympathetic nerve terminals. *Brain Res.* 737: 343-346 (1996)
- 17) Matsumoto, M., Yoshioka, M., Togashi, H., Hirokami, M., Tochiara, M., Ikeda, T., Smith, C.B. & Saito, H.: *Mu*-Opioid receptors modulate noradrenaline release from the rat hippocampus as measured by brain microdialysis *Brain Res.* 636: 1-8 (1994)
- 18) Sharp, T. & Foster, G.A.: Release of 5-hydroxytryptamine (5-HT) from medullary and mesencephalic raphé neurones after grafting to the rat hippocampus: Evidence for regulation by 5-HT_{1A} autoreceptors. *Neurosci Lett.* 132: 179-182 (1992).

- 19) Gobert, A. & Millan, M.J.: Modulation of dialysate levels of dopamine, noradrenaline, and serotonin (5-HT) in the frontal cortex of freely-moving rats by (-)-pindolol alone and in association with 5-HT reuptake inhibitors: comparative roles of beta-adrenergic, 5-HT_{1A}, and 5-HT_{1B} receptors. *Neuropsychopharmacology* 21: 268-284 (1999)
- 20) Ishida, J., Iizuka, R. & Yamaguchi, M.: High-performance liquid chromatographic determination of 5-hydroxyindoles by post-column fluorescence derivatization. *Analyst* 118: 165-169 (1993)
- 21) Ishida, J., Yoshimura, M. & Yamaguchi, M.: Simultaneous determination of urinary catecholamines and 5-hydroxyindoleamines by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analyst* 123: 307-311 (1998)
- 22) Mitsui, A., Nohta, H. & Ohkura, Y.: High-performance liquid chromatography of plasma catecholamines using 1,2-diphenylethylenediamine as precolumn fluorescence derivatization reagent. *J Chromatogr*, 344: 61-70 (1986)
- 23) Nohta, H., Lee, M.K. & Ohkura, Y.: Fluorescent products of the reaction for the determination of catecholamines with 1,2-diphenylethylenediamine. *Anal. Chim. Acta* 267: 137-139 (1992).
- 24) Ishida, J., Yoshitake, T., Fujino, K., Kawano, K., Kehr, J. & Yamaguchi, M.: Serotonin monitoring in microdialysate from rat brain by microbore-liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta*, 365: 227-232 (1998)
- 25) Nakahara, D., Hashiguti, H., Kaneda, N., Sasaoka, T. & Nagatsu, T.: Normalization of tyrosine hydroxylase activity in vivo in the striatum of transgenic mice carrying human tyrosine hydroxylase gene: a microdialysis study. *Neurosci.Lett.*, 158: 44-46 (1993)
- 26) Rollema, H., Alexander, G.M., Grothusen, J.R., Matos, F.F. & Castagnoli, N. Jr.: Comparison of the effects of intracerebrally administered MPP⁺ (1-methyl-4-phenylpyridinium) in three species: microdialysis of dopamine and metabolites in mouse, rat and monkey striatum. *Neurosci. Lett.*, 106: 275-281 (1989)
- 27) Fujino, K., Yoshitake, T., Inoue, O., Ibi, N., Kehr, J., Ishida, J., Nohta, H. & Yamaguchi, M.: Increased serotonin release in mice frontal cortex and hippocampus induced by acute physiological stressors. *Neurosci. Lett.* 320: 9195 (2002)
- 28) Yamaguchi, M., Yoshitake, T., Fujino, K., Kawano, K., Kehr, J. & Ishida, J.: Determination of norepinephrine in microdialysis samples by microbore column liquid chromatography with fluorescence detection following derivatization with benzylamine. *Anal. Biochem.* 270: 296 (1999)
- 29) Yoshitake, T., Fujino, K., Kehr, J., Ishida, J., Nohta, H. & Yamaguchi, M.: Simultaneous determination of norepinephrine, serotonin, and 5-hydroxyindole-3-acetic acid in microdialysis samples from rat brain by microbore column liquid chromatography with fluorescence detection following derivatization with benzylamine. *Anal Biochem*, 312: 125-133 (2003)
- 30) Fujino, K., Yoshitake, T., Kehr, J., Nohta, H. & Yamaguchi, M.: Simultaneous determination of 5-hydroxyindoles and catechols by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection following derivatization with benzylamine and 1,2-diphenylethylenediamine. *J. Chromatogr. A*, In press.