

HPLC-ECD를 이용한 흰쥐의 뇌 중 감마 아미노부티르산 및 글루탐산의 정량

강종성* · 이순철

충남대학교 약학대학

(Received March 15, 1999)

Determination of γ -Aminobutyric Acid and Glutamic Acid in Rat Brain by High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection

Jong-Seong Kang* and Soon-Chul Lee

College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

Abstract — A sensitive and efficient assay method was applied to determine the level of glutamic acid (GA) and γ -aminobutyric acid (GABA) in frontal cortex and hippocampus of rat administrated with ethanol and drugs. The compounds were derivatized with *o*-phthalaldehyde (OPA) and 2-mercaptoethanol for pre-column analysis. The condition for the simultaneous determination of GA, GABA and β -aminobutyric acid (BABA) by high performance liquid chromatography with electrochemical detection was reverse phase C_{18} column as stationary phase, 0.1 M phosphate buffer containing 0.1 mM Na_4EDTA : methanol=55 : 45 (v+v) pH 3.8 as mobile phase and 0.7V electrode voltage. The stability of reaction product of GA, GABA and BABA with OPA could be increased by adding the same volume of polyethylene glycol 400 to reaction mixture. The GABA level in frontal cortex of rat was significantly decreased by the administration of picrotoxin and diazepam, but it was significantly increased by the administration of red ginseng total saponin, N-methyl-D-glucamine and (-)-deprenyl.

Keywords □ γ -Aminobutyric acid, glutamic acid, polyethylene glycol, HPLC-ECD, rat brain.

γ -aminobutyric acid(GABA)는 포유류에서 매우 중요한 억제성 신경 전달 물질로서 glutamate로부터 합성되며 피질, 기저신경절, 해마, 시상하부, 편도체 등에 주로 분포되어 있다. 포유류에서 GABA수용체는 $GABA_A$ 와 $GABA_B$ 등 2가지 형태가 밝혀져있다. $GABA_A$ 는 벤조디아제핀 수용체, chloric ionophore를 포함하는 거대분자의 일부분으로 생각되며, 이 수용체의 효능약물은 항경련제로, 길항약물은 경련제로 응용되기 때문에 경련발현에 미치는 GABA의 역할에 대해 최근 많은 관심이 쏠리고 있다. $GABA_B$ 수용체는

$GABA_A$ 수용체보다 낮은 농도로 존재하며 벤조디아제핀 류에 의해 조절되지 않고 chloride 이온의 막투과성에도 관여하지 않는다. 에탄올은 다양한 연령 및 계층에서 남용되는 대표적인 향정신성 약물로 중추신경계에 작용하여 감정적, 정신적 장애를 유발하며 특히 만성적으로 남용할 경우 치매, 기억상실, 경련, 환각, 말초 신경 이상 등의 신경학적 변화를 유발한다.^{1,2)} 에탄올은 중추 신경전달 물질에 다양하게 영향을 미치며³⁾ 특히 GABA 신경의 활성을 증가시켜 근육이완, 진정 및 수면 등에 부분적으로 작용하는데, 이것은 GABA 효능 약물에 의해 강화되고 길항체에 의해 역전되는 것으로 알려져있다.^{4,5)} 이러한 약리학적 및 생리학적 자극에 의해 조직 중의 GABA 및 glutamate의 농도가 변화하

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 042-821-5928 (팩스) 042-823-6566

므로 이것을 관찰하여 약물의 약리학적 기전을 연구할 수 있다.

생체 중 GABA나 glutamic acid (GA)를 측정하기 위해서는 대부분의 경우 형광^{6,8)}이나 전기화학 검출기 (ECD)^{9,10)}를 장착한 HPLC법을 이용하고 있지만 GC-MS^{11,12)}나 모세관 전기영동기(CE)¹³⁻¹⁵⁾도 이들 분석에 사용되고 있다. 한편, HPLC로 GABA와 GA를 분석하기 위해서는 이들이 전기화학적 활성 및 자체 형광이 없기 때문에 OPA(*o*-phthalaldehyde)를 반응시켜 형광검출기 또는 ECD로 검출하는 방법이 이용된다.

OPA는 일급아민과 짧은 시간에 반응하는데, 반응생성물인 alkylthio-N-alkylisoindole의 수율이 좋을 뿐 아니라 반응생성물은 형광을 나타내고 전기화학적으로도 활성이 있으므로 이 방법은 HPLC로 일급아민을 정량하는 수단으로 널리 사용되고 있다. 하지만 2-ME를 이용한 OPA의 반응생성물은 안정성이 약하기 때문에¹⁶⁾ 이 반응은 주로 HPLC의 분리 후 반응법에 일반적으로 응용되고 있다. 분리 후 반응법은 확산으로 인하여 인접한 피크의 분리가 잘 안되며 시약의 소실이 크다는 단점이 있으므로 피크의 분리가 불확실한 경우에는 분리 전 반응법을 이용해야 할 때도 있다. 분리 전 반응법을 이용하여 HPLC로 일급아민을 분석하기 위해서는 반응생성물의 안정성 때문에 시료와 OPA의 반응을 시작한 수분 이내에 HPLC에 주입해야만 하는데 자동 주입기를 쓰는 경우에는 안정성 확보가 문제가 된다. OPA와 일급아민의 반응생성물의 안정성을 확보하기 위한 많은 연구가 진행되었는데, 그 중 Simons 등¹⁷⁾은 2-ME, 일급아민, OPA의 반응생성물에 있어서 thiol기가 분해의 주요 원인임을 밝혔다. 그래서 2-ME 대신 sodium sulfite를 이용하여 안정성이 더 좋은 N-alkylisoindole sulfonate를 생성물로 얻을 수 있었지만^{18,19)} 이 반응을 ECD를 이용한 HPLC에 적용할 경우 과량 들어간 sodium sulfite가 전극을 강하게 자극하여 기준선이 불안할 뿐 아니라, GA와 GABA의 머무름 시간의 차이가 너무 커서 분석 시간이 지연된다는 단점이 있다. 반응액에 계면활성제 등 다른 물질을 첨가함으로써 2-ME에 의한 alkylthio-N-alkylisoindole을 안정화시키려는 시도도 있었지만 안정성을 크게 증가시키지는 못했다. 본 논문에서는 polyethylene glycol(PEG)을 이용하여 GABA와 GA의 OPA 반응생성물의 안정도를 증가시켰으며, 반응생성물을 HPLC로 분석시 이동상의 최적 pH를 설정하

였다. 수종의 약물을 투여한 흰쥐의 전피질과 해마조직 중 GABA와 GA의 함량 측정에 이 방법을 적용하여 좋은 결과를 얻었다.

실험방법

시약 및 기기 - glutamic acid(GA), γ -aminobutyric acid(GABA), β -aminobutyric acid(BABA), 2-mercaptoethanol(2-ME), N-methyl-D-glucamine(GLU), (-)-deprenyl HCl(DEP), picrotoxin(PIC) 및 diazepam (DZP)은 Sigma제품을 *o*-phthalaldehyde(OPA)는 Fluka 제품을 사용하였고, 인삼조사포닌(TS)은 한국인삼연초 연구소에서 추출하여 정제한 것을 공급받아 사용하였다. 그 외 산, 알칼리, 유기용매 및 polyethylene glycol (PEG)류는 국내외의 특급시약을 사용하였으며 물은 3차 증류수를 사용하였다. HPLC system은 Shimadzu 사 LC-10AD 펌프와 SIL10A 자동주입기로 구성하였고, 검출기는 HP사 HP1049A Programmable ECD를 사용하였다.

실험동물 및 약물투여 - 한국실험동물원에서 공급받은 150~200 g의 Sprague Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였다. 사육실은 24±1°C의 통풍장치를 가동시켰고 12시간을 주기로 명암을 조절하였다. 사육시 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 에탄올은 3차 증류수로 희석하여(50% w/v) 3 g/kg의 용량으로 경구 투여하였고 대조군은 생리식염수를 투여하였다. TS, GLU, DEP, PIC 및 DZP는 증류수에 용해하여 에탄올 투여 30분전에 경구 투여하였다.

OPA반응액 - OPA 13.4 mg을 에탄올 0.5 ml에 녹인 용액에 2-ME 20 μ l을 가하고 0.1M 붕산완충액 (pH 9.1)으로 채워 10 ml가 되게 하였다. 이 액은 매일 새로 만들어 사용하였다.

조직의 분리 및 시료조제 - 흰쥐의 귀 뒷부분을 단두한 뒤 뇌 전체를 적출하여 5°C이하의 생리식염수에 담구어 혈액을 제거하였다. Palkovits 등²⁰⁾의 방법을 이용하여 얼음 상에서 brain slicer로 뇌를 1 mm 두께로 자른 후 전피질 (frontal cortex), 해마 (hippocampus)와 선조체(striatum)를 얻어 무게를 측정하고 dry ice상에서 순간적으로 동결시켜 -70°C에 보관하였다. 분석직전에 조직을 얼음 상에서 녹이고 조직이 담긴 tube에 4°C 이하로 냉각된 이동상 400 μ l과 내부표준액 (BABA, 50 μ g/ml) 400 μ l를 넣었다. 초음파 homo-

genizer(Cole Parmer 4170)로 2~3초씩 조적이 완전히 분해될 때까지 수회 반복처리하고 4°C에서 15000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상징액 100 μ 에 동량의 OPA반응액을 가하여 완전히 섞은 후 필요에 따라 PEG400 200 μ 를 다시 가하여 섞고 이 액 10 μ 를 HPLC에 주입하였다.

시료축정조건 - HPLC고정상은 NovaPak C₁₈(3.9×150 mm), 이동상은 0.1 mM Na₄EDTA를 포함하는 0.1M 인산완충액 : 메탄올=55:45(v+v)액으로 하여 최종 pH를 3.8로 조정하였다. 이동상의 유속은 0.8 ml/min, 컬럼의 온도는 30°C, 자동주입기의 온도는 4°C로 하였다. ECD의 작업전극은 glassy carbon electrode를 사용하여 은/염화은전극을 기준으로 0.7V를 유지하였다.

결과 및 고찰

이동상의 pH가 용량인자(k')에 미치는 영향 - 이동상의 최적 pH를 구하기 위하여 여러 가지 pH에 대한 용량인자를 관찰하였다. pH를 3.4에서 7.5까지 변화시키면 Fig. 1과 같이 용량인자가 작아졌다. GA의 경우 pH 5이상에서는 거의 해리 되므로 용량인자의 변화는 크지 않았으나 GA보다 상대적으로 산성도가 낮은 GABA는 pH 5이상에서도 해리 되어 용량인자가 점점 작아졌다. pH 5이상에서 GA와 GABA의 분

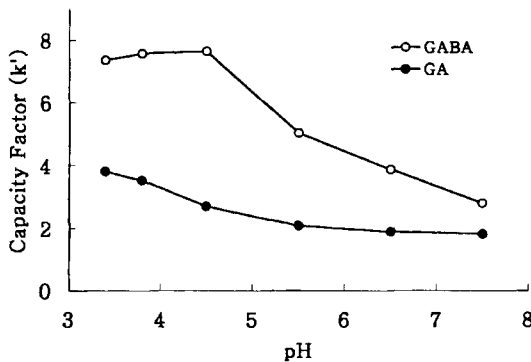


Fig. 1 - Effect of pH of the mobile phase on the retention of GA (—●—) and GABA (—○—). Stationary phase; NovaPak C₁₈ (3.9 × 150 mm), mobile Phase; 0.1M phosphate buffer (included 0.1 mM Na₄EDTA) : methanol=55:45 (v+v), column temperature; 30°C. The capacity factor, k', was calculated by $k'=(t_R-t_0)/t_0$ where t_R is the retention time of the compound of interest and t_0 the retention time of an unretarded component.

리도는 양호하였으나 GA의 용량인자가 너무 작아 시료에서 유출되는 각종 물질에 의해 방해되었고, pH 4.5에서는 GABA의 용량인자가 커서 분석시간이 길어졌으므로 이동상의 적정 pH를 3.8로 하였다.

GA, GABA와 OPA 반응생성물의 안정성 - OPA는 일급아민과 짧은 시간에 반응하지만 반응생성물의 안정성은 약한 편이다. 반응생성물인 alkylthio-N-alkylisoindole의 안정도는 반응액 중의 수분의 함량에도 크게 영향을 받는데¹⁶⁾ 이것에 착안하여 수분을 흡수하고 이를 조절할 수 있는 PEG를 반응액에 첨가하였을 경우 반응생성물의 안정성을 증가시킬 수 있었다. 예비실험에서 PEG를 반응액에 반응액의 부피 이상으로 섞었을 때 효과가 나타났으며, 반응액의 1.5배 정도에서는 그 효과가 매우 좋았다. Fig. 2는 GA와 OPA의 반응액에 PEG200, PEG400, PEG1000을 각각 동량을 가했을 때 반응시간에 따른 피크넓이의 변화를 나타낸 것이다. 반응직후와 비교하여 반응 2시간 후의 피크넓이는 PEG를 넣지 않은 경우 55% 정도 감소하였으나, PEG200, PEG400, PEG1000을 가했을 경우 각각 10%, 2%, 22% 감소하였다. 생성물을 안정시키는 효과는 PEG400이 가장 우수하였으므로, PEG400이 GABA, BABA와 OPA의 반응생성물의 안정도에 미치는 영향을 살펴보았다. GABA의 경우 PEG를 가하지 않으면 반응 1시간 후에는 피크를 거의 관찰할 수 없는 반면, 반응액에 반응액과 동량의 PEG를 가하면 반응 2시간 후 까지도 피크넓이가 6% 정도만 감소하였다. BABA의 경우 PEG를 가하지 않으면 반응 2

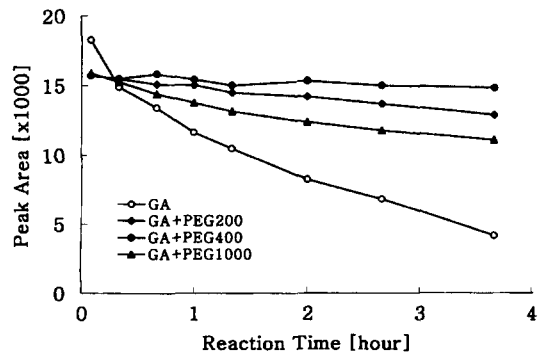


Fig. 2 - The stabilizing effect of type of PEG on the reaction product of GA with OPA. Peak area of GA without PEG (—○—) and that of GA after 50% addition of PEG200 (—◆—), PEG400 (—●—) and PEG1000 (—▲—) to reaction mixture was plotted vs. reaction time. The reaction was carried out at room temperature.

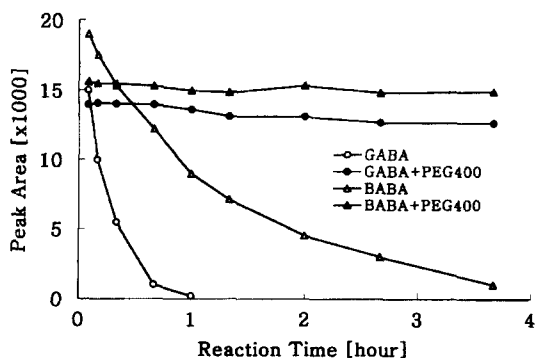


Fig. 3 - The stabilizing effect of PEG400 on the reaction product of GABA and BABA with OPA. Peak area of GABA (-○-) and BABA (-△-) without PEG400 and that of GABA (-●-) BABA (-▲-) after 50% addition of PEG400 to reaction mixture was plotted vs. reaction time. The reaction was carried out at room temperature.

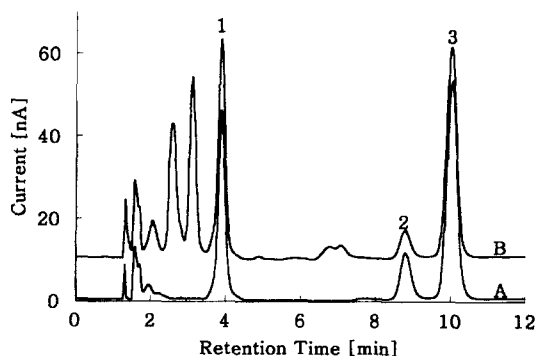


Fig. 4 - Chromatograms of a mixture of GA, GABA and BABA standard (A) and a hippocampus homogenate of rat brain (B). Stationary phase; NovaPak C₁₈ (3.9 × 150 mm), mobile Phase; 0.1M phosphate buffer (included 0.1 mM Na₂EDTA) : methanol=55 : 45 (v+v), pH 3.8, column temperature; 30°C, flow rate; 0.8 ml/min, ECD-electrode; glassy carbon electrode (+0.7V vs. Ag/AgCl). Peaks: 1.GA, 2.GABA, 3.BABA.

시간 후 피크높이가 76% 감소하였으나 PEG를 가하면 5% 정도만 감소하였다. 이 실험은 상온에서 실시한 것으로 실제 자동 주입기를 4°C 이하로 유지했을 경우 안정성이 이것보다 훨씬 증가하였다. 시료액 중의 GA와 GABA의 농도가 아주 미량이 아닐 경우는 반응액 중에 PEG400을 2배 이상 가함으로써 반응생성물의 안정도를 더욱 높일 수 있는 것을 확인하였다.

검량선 작성 및 시료분석 - Fig. 4는 GA, GABA, BABA 표준액과 시료의 크로마토그램으로 세 개의 성분이 타 물질의 영향을 받지 않고 분리되었음을 보여준다. BABA를 내부표준물질로 하여 피크의 높이비로 구한 GA(2~40 µg/ml)와 GABA(0.5~10 µg/ml)에 대

한 검량선은 양호한 직선성을 보였고, 직선의 식과 상관계수 값은 각각 $y(\text{피크의 높이비}) = 0.059 \times (\text{농도}, \mu\text{g/ml}) + 0.002 (r = 0.9991)$, $y(\text{피크의 높이비}) = 0.047 \times (\text{농도}, \mu\text{g/ml}) - 0.015 (r = 0.9992)$ 이었다. 검출한계는 GA 10 ng/ml(100 ng/g tissue), GABA 20 ng/ml(200 ng/g tissue)으로 뇌 조직 중에서 이들 물질을 정량하기에 충분하였다.

약물투여에 따른 뇌 중 GA 및 GABA의 변화 - Table I은 에탄올 및 에탄올과 약물의 급성투여 후 흰쥐 뇌의 전피질 및 해마 조직 중 GABA와 GA의 함량 변화를 검토한 것이다. 에탄올은 해마조직에서 GA 함량의 현저한 변화 없이, GABA 함량만을 유의성 있

Table I - Effects of single dose of PIC, DZP, TS, GLU and DEP on the concentrations of GABA and GA in frontal cortex and hippocampus of ethanol-treated rats

Treatment	Frontal Cortex		Hippocampus	
	GABA	GA	GABA	GA
Saline	0.22 ± 0.02	1.40 ± 0.10	0.20 ± 0.01	1.38 ± 0.08
Ethanol	0.20 ± 0.01	1.40 ± 0.23	0.23 ± 0.01 ^g	1.27 ± 0.08
PIC	0.17 ± 0.02*	0.93 ± 0.05***	0.24 ± 0.03	1.07 ± 0.14
DZP	0.17 ± 0.01**	1.50 ± 0.05	0.26 ± 0.01***	1.36 ± 0.06
TS	0.26 ± 0.02***	1.35 ± 0.09	0.27 ± 0.01	1.25 ± 0.07
GLU	0.32 ± 0.04***	1.53 ± 0.21	0.27 ± 0.01	1.19 ± 0.03
DEP	0.24 ± 0.01**	1.42 ± 0.17	0.21 ± 0.02	1.14 ± 0.14

TS (200 mg/kg), GLU (500 mg/kg), DEP (25 mg/kg), PIC (1.25 mg/kg) and DZP (0.1 mg/kg) were given 30 min before ethanol administration (3 g/kg, p.o.) in individual animal group. Rats were sacrificed by decapitation at 1 hr following ethanol administration. Values represent mean ± S.E.M. (mg/g tissue) of 3 to 12 rats. *p<0.1, **p<0.05 and ***p<0.01 when compared with ethanol-treated rats in frontal cortex, ^{###}p<0.01 when compared with GABA concentration of DZP-treated rats in frontal cortex, and ^gp<0.1 when compared with saline-treated rats in hippocampus. GA; glutamic acid, GABA; γ-aminobutyric acid, TS; red ginseng total saponin, GLU; N-methyl-D-glucamine, DEP; (-)-deprenyl, PIC; picrotoxin, DZP; diazepam.

게 증가시켰으나, 전피질의 GABA 및 GA 함량에는 영향을 미치지 않았다. PIC 및 DZP는 전피질의 GABA 및 GA 함량에 대한 에탄올의 효과를 유의성 있게 억제하였으며, TS는 전피질 및 해마의 GA 함량에는 영향 없이 GABA 함량만을 유의성 있게 증가시켰다. 한편 뇌기능 개선 약물인 GLU와 monoamine oxidase 억제제인 DEP는 전피질의 GABA 함량만을 유의성 있게 증가시켰다. 뇌 중 전피질이 단기 기억과 장기 기억에, 해마 조직이 장기 기억에 중요한 부위임이 보고되어 있는²¹⁾ 점을 고려할 때, DZP로 인한 전피질과 해마 조직 중 GABA 함량의 유의적인 변화와 PIC, GLU 및 DEP이 전피질 GABA 신경활성에 선택적인 이러한 실험결과는 에탄올 단기투여로 유발되는 학습획득 손상 및 개선에 전피질 GABA 신경활성이 관여함을 시사하고 있다. 전피질과 해마 조직의 GABA 함량이 DZP를 투여시 두 조직간에 유의적인 차이를 보이는 것과 더불어, PIC, GLU 및 DEP가 전피질 GABA 신경활성에 선택적인 실험결과는 뇌 중 전피질과 해마 조직의 GABA 신경이 다른 신경과 연계되어 있는 점을 고려할 때, 이러한 약물이 GABA 신경에 직접 또는 GABA 신경활성을 거쳐 간접적으로 뇌 내 많은 신경활동에 영향을 미칠 것으로 생각되며, 이 실험방법은 다수의 약물 작용기전 및 작용부위 연구에 도움을 줄 것이다.

결 론

흰쥐의 뇌 중 GA와 GABA를 NovaPak C₁₈(3.9 × 150 mm) 컬럼과 0.1 mM Na₄EDTA를 포함하는 0.1M 인산완충액 : 메탄올 = 55 : 45(v+v)액(pH 3.8)으로 분석하였다. 이동상의 유속은 0.8 ml/min, 컬럼의 온도는 30°C, 자동주입기의 온도는 4°C, ECD의 작업 전극은 glassy carbon electrode를 사용하여 은/염화은 전극을 기준으로 0.7V를 유지했을 때 분리도 및 감도가 좋았다. GA, GABA 및 BABA와 OPA의 반응액에 반응액과 동량의 PEG400을 첨가하였을 경우 반응생성물의 안정도를 현저히 증가시킬 수 있었다. 이 방법으로 에탄올 및 에탄올과 수중 약물의 급성투여 후 흰쥐 뇌의 전피질 및 해마 조직 중 GABA와 GA의 함량 변화를 측정할 수 있었다. 함량 측정 결과는 TS, GLU 및 DEP은 전피질의 GABA 함량을 유의성 있게 증가시켰으나, PIC 및 DZP는 전피질에서 에탄올

의 효과를 억제하여 GABA 함량을 감소시켰다.

감사의 말씀

이 논문은 보건복지부의 지원(HMP-97-D-5-0032)으로 수행되었음.

문 헌

- 1) Samson, H. H. and Harris, R. A. : Neurobiology of alcohol abuse. *Trends in Pharmacol. Sci.* **13**, 206 (1992).
- 2) Holden, C. : Alcoholism the medical cost crunch. *Science* **235**, 1132 (1987).
- 3) Holloway, F. A. : State-dependent effects of ethanol on active and passive avoidance learning. *Psychopharmacol.* **78**, 71 (1982).
- 4) Ticku, M. K. : Benzodiazepine-GABA-receptor-ionophore complex. *Neuropharmacol.* **22**, 1459 (1983).
- 5) Martz, A., Deitrich, R. A. and Harris, R. A. : Behavioral evidence for the involvement of gamma-aminobutyric acid in the action of ethanol. *Eur. J. Pharmacol.* **89**, 53 (1983).
- 6) Kehr, J. : Determination of γ -aminobutyric acid in microdialysis samples by microbore column liquid chromatography and fluorescence detection. *J. Chromatogr.* **708**, 49 (1998).
- 7) Kehr, J. : Determination of glutamate and aspartate in microdialysis samples by reversed-phase column liquid chromatography with fluorescence and electrochemical detection. *J. Chromatogr.* **708**, 27 (1998).
- 8) Ross, C. D., Godfrey, D. A. and Parli, J. A. : Amino acid concentrations and selected enzyme activities in rat auditory, olfactory, and visual systems. *Neurochem. Res.* **20**, 1483 (1995).
- 9) Chanpney, T. H., Hanneman, W. H. and Nichols, M. A. : γ -aminobutyric acid, catecholamine and indoleamine determinations from the same brain region by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr.* **579**, 334 (1992).
- 10) Murai, S., Saito, H., Nagahama, H., Miyate, H., Masuda, Y. and Itoh, T. : Ultra-rapid assay of brain γ -aminobutyric acid by liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr.* **497**, 363 (1989).

- 11) Palaty, J., Burton, R. and Abbott, F. S. : Rapid assay for γ -aminobutyric acid in mouse brain synaptosomes using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **662**, 85 (1994).
- 12) Norman, E. J., Wee, E. L. and Zimmerman, E. F. : Rapid gas chromatographic-mass spectrometric quantitation of gamma-aminobutyric acid in biological specimens. *J. Chromatogr.* **337**, 21 (1985).
- 13) Dawson, L. A., Stow, J. M. and Palmer, A. M. : Improved method for the measurement of glutamate and aspartate using capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection and its application to brain microdialysis. *J. Chromatogr.* **694**, 455 (1997).
- 14) Lada, M. W. and Kennedy, R. T. : Quantitative in vivo monitoring of primary amines in rat caudate nucleus using microdialysis coupled by a flow-gated interface to capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Anal. Chem.* **68**, 2790 (1996).
- 15) Church, W. H., Lee, C. S. and Dranchak, K. M. : Capillary electrophoresis of glutamate and aspartate in rat brain dialysate-Improvements in detection and analysis time using cyclodextrins. *J. Chromatogr.* **700**, 67 (1997).
- 16) Jacobs, W. A., Leburg, M. W. and Madaj, E. J. : Stability of *o*-phthalaldehyde-derived isoindoles. *Anal. Biochem.* **156**, 334 (1986).
- 17) Simons, S. S. Jr. and Johnson, D. F. : Ethanethiol: a thiol conveying improved properties to the fluorescent product of *o*-phthalaldehyde and thiols with amines. *Anal. Biochem.* **250**, 82 (1977).
- 18) Jacobs, W. A. : *O*-phthalaldehyde-sulfite derivatization of primary amines for liquid chromatography-electrochemistry. *J. Chromatogr.* **392**, 435 (1987).
- 19) Smith, S. and Sharp, T. : Measurement of GABA in rat brain microdialysates using *o*-phthalaldehyde-sulphite derivatization and high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr.* **652**, 228 (1994).
- 20) Palkovits, M. and Brownstein, M. : *Maps and guide to microdissection of the rat brain* Elsevier, N. J., pp. 202 (1988).
- 21) Lee, S. C., You, K. H. and Kim, E. B. : The functional role of limbic system on memory. *J. Pharm. Sci.* **11**, 1 (1995).