

交感作用及 α -肾上腺素能受体兴奋作用⁽²⁾, 气道高反应性病人应慎用; 必要时应与阿托品、氟哌啶同用。在 Mor 引起的支气管痉挛中, 我们建议用 NaI 治疗。

REFERENCES

- 1 Stanley TH. Pharmacology of intravenous narcotic anesthetics. In: Miller RD, editor. Anesthesia. New York: Churchill Livingstone, 1981; 425-49.
- 2 Yasuda I, Hirano T, Yusa T, Satoh M. Tracheal con-

striction by morphine and by fentanyl in man. Anesthesiology 1978; 49: 117-9.

- 3 Zauder H, Nichols RJ. Intravenous anesthesia. In: Fabian L, editor. Clinical anesthesia, a decade of clinical progress. Philadelphia: Davis, 1971: 317-57.
- 4 Kneussel MP, Richardson JB. Alpha-adrenergic receptors in human and canine tracheal and bronchial smooth muscle. J Appl Physiol 1978; 45: 307-11.
- 5 Shen JF, Hui NN, Fu CZ. Naloxone relieves the bronchospasm during anesthesia. Acta Acad Med Nanjing 1991; 11: 317.

458-461

20

维 A 酸的反相高压液相色谱测定法

R 969

蒋新国, 奚念朱 (上海医科大学生物药剂学研究室, 上海200032, 中国)

A reversed-phase HPLC method for determining tretinoin

JIANG Xin-Guo, XI Nian-Zhu (Division of Biopharmaceutics, Shanghai Medical University, Shanghai 200032, China)

ABSTRACT Tretinoin (Tre) and its active stereo isomer isotretinoin (Iso) were simultaneously determined by reversed-phase high pressure liquid chromatographic method with a uv detector adjusted to 348 nm. Separation was accomplished on YWG-C₁₈ column by using a MeOH:NH₄Ac buffer (pH 6.0) 85:15 (vol:vol), chlorpromazine (Chl) being chosen as internal standard. Minimal detectable amount of Tre was 0.5 ng. Calibration curve was linear (r=0.9999) in the concentration range of 25-2500 ng·ml⁻¹. This method was used to determinate the transdermal amounts of Tre from three different preparations in Franz diffusion cell in vitro. The re-

sults showed that the proposed method could distinguish the transdermal differences from various formulations or different skin samples. In addition, it is able to be used in quantitative analysis of Tre and Iso.

KEY WORDS tretinoin; isotretinoin; high pressure liquid chromatography; cutaneous administration

A 摘要 用反相高压液相色谱法同时测定透皮接受液中维 A 酸及其活性异构体异维 A 酸的量, 以此评价维 A 酸的体外透皮情况。固定相为 YWG-C₁₈ 化学键合相, 流动相为甲醇: 醋酸铵缓冲液 (pH 6.0) 85:15, 内标氯丙嗪。检测波长 348 nm, 最低检测量 0.5 ng, 线性范围 25-2500 ng·ml⁻¹。本法适用于维 A 酸的体外透皮研究及含量测定。

关键词 维 A 酸; 异维 A 酸; 高压液相色谱法; 经皮给药

Received 1992-12-29

Accepted 1993-09-09

维 A 酸 (tretinoin, Tre) 常用的定量方法

有 uv 分光光度法^[1]，比色法^[2]和高压液相色谱法(HPLC 法)^[3,4]。体外透皮试验过程中，由于 Tre 较易转变成其它异构体，加上透皮接受液中皮肤脂类溶出物的干扰，故不能直接使用 uv 法或比色法。HPLC 法虽能测定透皮样品中 Tre 的量，但测得的并不是透过皮肤的 Tre 总量，因其中一部分已转变成其它异构体。本文建立了一种可同时测定 Tre 及其主要异构体异维 A 酸(isotretinoin, Iso)的 HPLC 方法，通过测定它们的总量评价 Tre 的透皮情况。

MATERIALS

Waters 481 系列 HPLC 仪(美国 Waters 公司)，超级恒温水浴(上海实验仪器厂)，85-2 型恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器厂)，Franz 扩散池(自制)。

Tre 样品，含量 $\geq 99.5\%$ ，mp 180-3 °C (上海第六制药厂 910510)；Iso 样品，含量 $\geq 99.5\%$ ，mp 173-6 °C (上海第六制药厂，911102)。MeOH, EtOH, (CH₃)₂CHOH, NaCl, NH₄Ac, glacial HAc 均为 AR。

METHODS

Mobile phase 流动相中 MeOH 含量越高或流动相的 pH 越高，Tre 及 Iso 的保留时间越短，NH₄Ac 对两者的峰形均有较好的改善作用。当流动相条件为 MeOH:NH₄Ac 缓冲液 (pH 6.0) 85:15 (vol:vol) 时，Tre 及 Iso 有适宜的保留时间且两者有较好的分离度。此时透皮接受液中的杂质对测定也无干扰 (Fig 1)。

Internal standard 对多个化合物进行选择，vitamin A acetate 与 Tre 及 Iso 虽有满意的分离度，但当它们混合振荡后，样品及内标的峰面积均有显著下降。其它酯类化合物如 phenyl salicylate, butylparaben 也有同样现象，提示 Tre 可能与这些酯类化合物发生酯交换反应。非酯类化合物 chlorpromazine (Chl) 与 Tre 及 Iso 能很好分离且无相互作用，故可选作内标。

Standard solutions 配制 Tre 及 Iso 0.5 mg·ml⁻¹ 的乙醇溶液为标准溶液，Chl 1 mg·ml⁻¹ 的乙醇溶液为内标溶液，0-5 °C 保存，用时稀释至所需浓度。标准

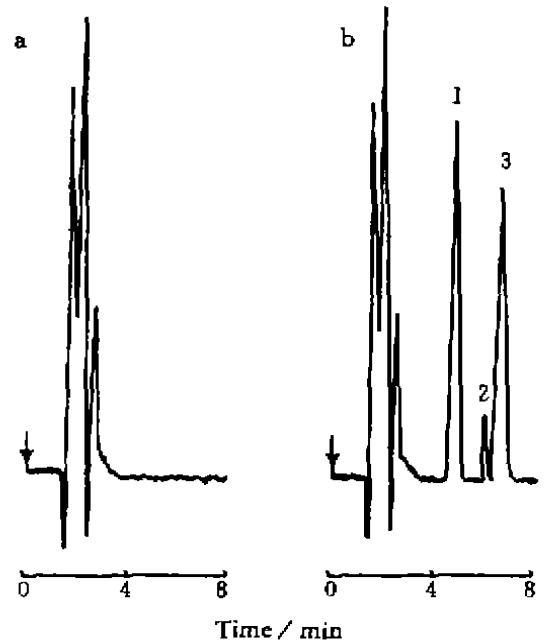


Fig 1. HPLC in transdermal study *in vitro*. a) blank; b) samples; 1 internal standard; 2 isotretinoin; 3 tretinoin.

溶液在棕色容量瓶内配制，在暗室内操作，并避免剧烈振荡，这样可减少 Tre 及 Iso 转变成其它异构体。标准溶液使用 3 d 后必须重新配制。

HPLC 不锈钢色谱柱：150 mm × 4.6 mm。固定相：YWG-C₁₈ 化学键合相 (10 μm, 天津试剂二厂)。流动相：MeOH:NH₄Ac 缓冲液 (pH 6.0) 85:15，流速 0.9 ml·min⁻¹。uv 检测波长 348 nm，检测器灵敏度 0.02 AUFS，数据处理仪衰减 16，环境温度 20-25 °C。内标 Chl。

Solvent system Tre 有 9 种异构体，在一定条件下可以互相转变，光照，溶剂条件等均可影响转变程度。为了尽可能减少 Tre 转变成其它异构体，整个实验除须在暗室中操作外，还需要选择一个使 Tre 最稳定的溶剂系统。我们比较了 MeOH, EtOH, (CH₃)₂CHOH, OCH₂CH₂CH₂CH₂, (C₂H₅)₂O, CHCl₃ 等溶剂系统以及 butylated hydroxytoluene, vitamin C 等稳定剂，结果表明，异丙醇:生理盐水 1:1 (vol:vol) 溶剂系统的稳定作用最佳，因此 Tre 的样品溶液及透皮接受液均采用该溶剂系统。

RESULTS

Linear range 吸取 Tre $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的乙醇溶液 5, 10, 20 μl 及 Tre $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的乙醇溶液 5, 10, 20, 50 μl , 分别加入等量的 Iso 乙醇溶液, 加内标溶液 10 μl , 最后加异丙醇-生理盐水溶剂系统至 1 ml, 轻轻混匀, 进样 50 μl 进行 HPLC 分析. 每一浓度配置 3 份样品, 每份样品进样 2 次, 取其平均值. 分别将 Tre 及 Iso 与 Chl 的峰面积比 (Y) 对相应的 Tre 及 Iso 浓度 (X) 回归, 得线性方程 $\hat{Y}_1 = 0.0767 + 2.3161X_1$ (Tre) 及 $\hat{Y}_2 = 0.0887 + 2.6547X_2$ (Iso). Tre 及 Iso 浓度在 25–2500 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 范围内与峰面积比有良好的线性关系 ($r = 0.9999$).

Precision and accuracy 吸取 Tre $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的乙醇溶液 10 μl 及 Tre $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的乙醇溶液 5, 30 μl , 分别加入等量的 Iso 乙醇溶液, 加内标溶液 10 μl , 再加异丙醇-生理盐水溶剂至 1 ml, 进样 50 μl , 分别测定 Tre 及 Iso. 一日内先后测定 5 份样品, 统计测定数据的变异系数 (CV) 即为日内精密度 (Tab 1). 同法制备样品, 分别在 5 日内进行 HPLC 分析, 统计日间精密度 (Tab 1).

将样品的测定值分别除以各自的加入量, 可考察本方法测定的准确度 (Tab 1).

若以 Tre 与 Iso 之和评价方法的精密度和准确度, 也可得到相同的结论.

Recovery 用异丙醇-生理盐水溶剂系统分别配制 Tre 0.5 和 $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 溶液, 置 4 只 Franz 释放池内, 按透皮试验条件观察 Tre 的变化情况, 避光, 32 $^{\circ}\text{C}$ 电磁搅拌 24 h 后进行 HPLC 测定. 将测得的 Tre 及 Iso 总量比 Tre 初始量, 计算回收率. 结果表明仅有小部分 Tre 转变为其主要异构体 Iso 且两者总量维持在 Tre 的初始水平 (Tab 2), 这一结果与文献^[5,6]报道相符.

Tab 1. Precision and accuracy of HPLC determination of tretinoin (Tre) and isotretinoin (Iso). $\bar{x} \pm s$.

	Added /ng	Measured /ng	Accuracy /%	CV /%
Within-day ($n=5$)				
Tre	2.50	2.54 ± 0.11	101.6	4.33
	12.5	12.48 ± 0.24	99.8	1.92
	75.0	74.7 ± 1.6	99.6	2.14
Iso	2.50	2.57 ± 0.11	102.8	4.28
	12.5	12.32 ± 0.24	98.6	1.95
	75.0	74.9 ± 1.3	99.9	1.74
Day-to-day ($n=17$)				
Tre	2.50	2.57 ± 0.14	102.8	5.45
	12.5	12.3 ± 0.5	98.4	4.07
	75.0	76.1 ± 2.1	101.5	2.76
Iso	2.50	2.59 ± 0.15	103.6	5.79
	12.5	12.3 ± 0.3	98.4	2.44
	75.0	76.0 ± 2.4	101.3	3.16

Tab 2. Recovery of tretinoin (Tre) in transdermal study *in vitro*. Tre 0.5 and $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ were prepared using isopropanol-saline (1:1, vol:vol) as a solvent. Samples were placed in 4 Franz cells, protected from light, maintained at 32 $^{\circ}\text{C}$ and stirred magnetically for 24 h. Amounts of Tre and isotretinoin (Iso) were determined by HPLC. $n=4$, $\bar{x} \pm s$.

Added/ μg	Tre	2.00	8.00
Measured/ μg	Tre	1.88 ± 0.09	7.64 ± 0.25
	Iso	0.100 ± 0.010	0.61 ± 0.04
	Tre+Iso	1.98	8.25
Recovery/%		99.0	103.1

Sensitivity 根据信噪比 $S/N \geq 2$ 的规定, 测得本方法中 Tre 及 Iso 的最低检测量均为 0.5 ng.

Specificity 将 Tre 样品经极端条件处理, 色谱图中增加 6 个峰, 其中仅有 1 个很小的峰介于 Tre 及 Iso 峰之间, 因此常规条件下 Tre 的分解产物不会干扰测定.

Application 选 SD 种大白鼠, ♀, 鼠龄 5–7 wk. 剪去鼠毛 24 h 后处死, 取皮, 除尽皮下脂肪, 洗净后置于 Franz 或 Valia-Chien 扩

散池的供给室与接受室间。配制3种不同处方的 Tre 制剂。处方 A 为 Tre 0.1 % 水包油型乳膏剂, 处方 B 为含 1 % Azone 的 Tre 0.1 % 水包油型乳膏剂, 各取 2 g 置于 Franz 池的供给室内; 处方 C 为 Tre 0.1 % 溶液剂, 取 4 ml 置于 Valia-Chien 池的供给室内。接受室内均用异丙醇-生理盐水接受液 4 ml。避光并恒温 32 °C, 电磁搅拌 24 h, 用本方法测定接受液中 Tre 及 Iso 的总量。处方 A, B, C 的透过量分别为 1.9 ± 1.0 , 2.3 ± 1.1 及 $36 \pm 10 \mu\text{g}$ ($n=4$)。由此可评价透皮促进剂 Azone 及剂型因素对 Tre 经皮吸收的影响。

DISCUSSION

体外透皮试验过程中, 透皮接受液中的 Tre 可部分转变成其它异构体, 因此仅仅以测定 Tre 的量作为评价依据就会低估它的实际透皮效果。研究表明, 当严格控制透皮试验的光照、溶剂等条件时, 仅有少量 Tre 转变成 Iso 而几乎没有其它异构体生成。因此通过测定透皮接受液中 Tre 及 Iso 总量来评价 Tre 的透皮效果, 可客观地反映 Tre 透皮的实际情况, 方法回收率为 99.0—103.1 %。

USP 规定用 uv 法测定制剂中 Tre 的含量, 但当原料不纯(含一种或数种异构体)或样

品的光照, 振摇过于剧烈时, uv 法就有一定的局限性。本法具有很好的专一性且能同时测定 Tre 及 Iso 的量。故除可用于体外透皮研究外, 还可用于 Tre 及 Iso 原料或制剂的含量测定及纯度检查。

ACKNOWLEDGMENTS 上海第六制药厂董雅蕊高级工程师赠 Tre 及 Iso 标准品。

REFERENCES

- 1 The United States Pharmacopeia Convention, Inc. The United States Pharmacopeia. 22nd revision. Rockville MD; Mack Printing Co, 1990; 1390—2.
- 2 Wang CC, Hodges RE, Hill DL. Colorimetric determination of all-trans-retinoic acid and 13-cis retinoic acid. *Anal Biochem* 1978; **89**: 220—4.
- 3 Puglisi CV, Silva JAF. Determination of retinoic acid and aromatic retinoic acid analogs possessing anti-tumor activity, in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1978; **152**: 421—30.
- 4 Kril MB, Burke KA, Dinunzio JE, Gadde RR. Determination of tretinoin in creams by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1990; **522**: 227—34.
- 5 Franz TJ, Lehman PA. Systemic absorption of retinoic acid. *J Toxicol-Cutan Ocular Toxicol* 1989/1990; **9**: 517—24.
- 6 Lehman PA, Malany AM. Evidence for percutaneous absorption of isotretinoin from the photoisomerization of topical tretinoin. *J Invest Dermatol* 1989; **93**: 595—9.

《中国药理学报》欢迎投稿

《中国药理学报》继续进入国际著名《科学引文索引》SCI 及 Current Contents, 并且保持引文率名列入选中国期刊前茅。继续入选国际药学药理学核心期刊, 成为其中唯一中国期刊并保持排名上升趋势。作者投稿我刊, 能最快地被国际同行检索, 获益最大。为扩大国际交流, 更好地光大发展我国药理事业, 欢迎广大作者将您的优秀论文(英文或中文)投寄我刊。