

레티놀의 생체시료 중 HPLC 분석 및 경피흡수

정연복[†] · 한 건

충북대학교 약학대학
(2000년 10월 13일 접수)

HPLC Analysis of Retinol in the Biological Fluids and Cutaneous Absorption after its Transdermal Administration

Youn Bok Chung[†] and Kun Han

College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea
(Received October 13, 2000)

ABSTRACT—The purpose of the present study was to investigate the topical bioavailability of retinol (vitamin A) after its transdermal administration. For this purpose, we developed the convenient HPLC method to measure the retinol concentration in the biological fluids such as plasma and skin tissues. The low detection limit was 0.1 µg/ml using a gradient HPLC system of UV detection. The initial plasma concentration of retinol was about 20 µg/ml after its i.v. bolus administration (4.32 mg/kg). The half life ($t_{1/2\alpha}$) in the distributive phase was 1.3 min, while retinol was slowly disappeared in the post-distributive phase. On the other hand, the maximum plasma concentration (C_{max}) was about 776 ng/ml after applying to rat skin at a dose of 43.2 mg/kg. Furthermore, the concentration of retinol in the skin tissues was about 600 ng/g tissue at 12 hr after its transdermal administration. In conclusion, the initial plasma concentration of retinol was comparable with the skin concentration after its cutaneous absorption, followed by being decreased with the passage of the time.

Keywords—Retinol, HPLC, Cutaneous absorption, Skin concentration, Plasma concentration.

최근 국내에서는 수종의 비타민을 함유하는 경피제제가 개발되어 시판되고 있고, 이에 대해 많은 기업에서 관심을 가지고 보다 유효한 제형 개발에 대한 연구가 진행되고 있다. 그러나 대부분의 비타민의 특성상, 피부에 대한 약리효과만이 인정되고 있을 뿐, 혈중 흡수 및 피부조직으로의 이행 등의 약물동태학적인 자료는 거의 보고되고 있지 않다. 대부분의 비타민은 생체내에서 미변화체로 또는 대사되어 약리작용을 나타낸다.

경피에 적용하는 비타민 중에서도 retinol(비타민 A)에 대한 연구결과가 많이 보고되고 있다. Retinol의 동족체로 새로 개발한 retinoid 제제는 여드름 치료에 효과가 인정되고 있다.¹⁾ 또한, retinol은 얼굴 등 피부의 주름을 예방 또는 제거할 목적으로 하는 기능성화장품 원료로서 국내에서도 널리 상용되고 있다. Retinol의 상용량을 사람의 경피에 적용하였을 경우에는 상당량이 미변화체로 피부에 잔존하며, 소량의 대사체들도 검출되고 있다.²⁾ 즉, 피부에 retinol의 적용시 일부만이 retinoic acid로 전환되어 약리효과를 나타낸다

고 보고되고 있다.²⁾

한편, 비타민 A의 경피적용후 피부 조직내의 농도양상은 경시적으로 변화된다고 보고되고 있다.³⁻¹¹⁾ 그러나, 경피적용후의 전신순환 혈중으로의 흡수 등에 관한 기초연구는 거의 보고되고 있지 않다. Thorne 등⁴⁾은 수종의 비타민을 주름을 제거할 목적으로 피부에 적용시, 반복투여하여도 혈중농도는 내인성 농도보다 유의성있게 높아지지 않는다고 보고하였다. 따라서, 대부분의 비타민은 피부에 적용시 전신순환 혈중으로의 이행이 매우 적을 것으로 추정된다.

이 연구에서는 동물실험에서 retinol을 피부에 적용한 후, 흡수 및 피부조직내 이행 등의 약물동태학적 연구를 하고자 하였다. 이를 위하여, retinol의 경피투여시 혈중으로의 이행율이 매우 적다는 점을 고려하여 혈장중 retinol의 HPLC 분석조건을 확립하였으며, retinol의 정맥투여후 혈장중농도를 측정하여 흡수율을 산출하였다. 또한, retinol을 경피투여한 후에는 혈장중 농도를 측정함과 동시에 피부조직내에 잔존하는 retinol을 분석하여, 실제 피부에 적용시의 임상효과 및 부작용 예측이란 측면에서 기초정보를 제공하고자 하였다.

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 043) 261-2824, E-mail : chungyb@cbucc.chungbuk.ac.kr

실험방법

시약 및 기기

Retinol (all-trans-retinol) 및 retinyl acetate는 Sigma Chemical Co. (U.S.A.)로부터 구입하여 사용하였으며, 기타 시약은 HPLC급 또는 특급을 사용하였다.

기기로는 HPLC (Jasco Co.: Model PU-980 펌프, UV-975 UV/VIS 검출기, LC-Net II control borwin 기록계, AS-950-10 자동주입기), pH 미터 (M520, Orion Research Inc., U.S.A.), 저온원심분리기 (GS-6KR, Beckman Industries, U.S.A.), 탁상용원심분리기 (Microfuge E, Beckman Industries, U.S.A.), 냉동고 (OPR-DFU-250, Operon ENG. Co., 국산), 초음파세척기 (M2010, Jinwoo ENG. CO., 국산), 진탕기 (Eurostar, IKA-Labortechnik Co., Germany), 호모게나이저 (Ultra-Turrax T25, IKA-Labortechnik Co., Germany) 등을 사용하였다.

실험동물

실험동물로는 숫흰쥐(200-250 g)를 삼육동물센터(경기도, 안성)로부터 구입하여 약학대학 동물사육장에서 항온, 항습 조건하에서 사육한 후 사용하였다.

HPLC에 의한 생체시료중 retinol 분리정량법 확립

혈장중 retinol 분석조건은 Barua 등¹²⁾ 및 보고된 방법들^{1,13-16)}을 종합하여 다음과 같이 개량하여 사용하였다. 즉, 혈장 100 μ l에 내부표준물질(retinyl acetate 100 ng)을 함유한 추출용매(이소프로판올/디클로로에탄, 2:1 v/v) 300 μ l를 가하여 15분간 진탕시킨 후 4°C, 3000 rpm에서 15분간 원심분리시켰다. 원심분리후 얻어진 유기용매층 300 μ l 중 40 μ l를 HPLC에 주입하였다. 경피중 retinol 분석조건은 pH 7.4 인산염 완충액을 넣어 20% 균질액으로 한 후 동일한 방법으로 정량하였다. HPLC 칼럼은 Capcell Pak C₁₈ Column (UG120Å, 4.6 mm×250 mm, 5 μ m, Shiseido,

Japan)을 사용하였다. 이동상 용매는 Table I과 같은 농도구배(gradient) 시스템을 사용하였다. 유속은 1.0 ml/min으로 하고, UV-검출기 파장은 325 nm에 고정하였다.

정맥 및 경피투여 후 혈장 및 피부조직 채취

정맥투여를 위해서는 흰쥐를 에텔로 가볍게 마취시킨 후 좌측 대퇴부 동맥 및 정맥에 폴리에틸렌튜브(PE-50, Intramedic, Clay Adams, U.S.A.)를 삽관하였다. 흰쥐가 마취로부터 회복된 후에 retinol(4.32 mg/kg)을 DMSO에 녹여 정맥주사하였다. 투여용량은 정맥주사후 모든 약물이 전신순환혈중으로 이행되는 점을 고려하여, 경피투여시의 1/10로 하였다. 약물투여 후 혈액을 대퇴동맥으로부터 경시적으로 채취하였다. 혈액 250 μ l를 마이크로튜브에 받아서 탁상용 원심분리기를 사용하여 원심분리후 얻어진 혈장 100 μ l를 정량에 사용하였다. 실험중에는 heat lamp를 사용하여 흰쥐의 체온을 37°C로 유지시켜 주었다.

경피투여를 위해서는 특별히 제작된 고정대를 사용하였다. 즉, 흰쥐의 다리를 모두 고정할 수 있고 양면에 지지대를 설치하여 양면을 사용할 수 있는 것으로서, 중앙의 일정부위는 약물을 흰쥐의 등면에 적용할 수 있도록 열려 있는 고정대를 제작하였다. 따라서, 한 쪽면에서는 동물수술이 가능하고, 반대 면에서는 약물의 경피 적용이 가능하도록 하였다. 흰쥐를 에텔로 가볍게 마취시킨 후 흰쥐의 등부위의 털을 제거한 다음, 좌측 대퇴부 동맥에 폴리에틸렌튜브(PE-50)를 삽관하였다. 흰쥐가 마취로부터 회복된 후에 흰쥐의 등부위에 retinol을 도포한 후 혈액을 대퇴동맥으로부터 경시적으로 채취하였다. 피부 적출을 위하여 12시간후 안락사 시킨 다음 피부를 적출하였다. 피부 적출시에는 피부표면의 약물을 완전히 제거하기 위하여 거즈로 일차 제거한 후 면도날을 가볍게 이용하여 표면에 잔존하는 약물을 완전히 제거하였다. 채취한 혈액 중의 약물분석은 정맥주사의 경우와 같은 방법으로 하였다. 피부중 약물분석은 pH 7.4 완충액을 넣어 20% 균질액으로 한 후 정맥주사의 경우와 같은 방법으로 하였다. 투여용량은 개발중인 연고제를 사용하여 retinol으로서 43.2 mg/kg으로 하였다.

Retinol은 빛과 공기에 노출되었을 때 신속하게 산화된다고 알려져 있다. 따라서, 시약 및 제제는 실험전까지 밀폐된 용기에 담아서 4°C에서 보관하였으며, 실험후 분석과정 등에는 차광하에서 수행하였다. 단, 흰쥐의 피부에 적용하여 방치하는 동안에는 임상적용시의 상태와 동일한 조건으로서 실험실의 빛과 공기에 노출되도록 하였다.

Table I—Composition of the Mobile Phase (Multi-Linear Binary Gradient)

| Time (min) | % Solvent A ^{a)} | % Solvent B ^{b)} |
|------------|---------------------------|---------------------------|
| 0.0 | 90 | 10 |
| 8.0 | 10 | 90 |
| 8.5 | 10 | 90 |
| 17.0 | 5 | 95 |
| 17.4 | 5 | 95 |
| 17.5 | 90 | 10 |

a) 1:1 v/v 0.5% aqueous ammonium acetate solution (pH 4)-methanol

b) 1:1 v/v methanol-isopropanol

정맥주사한 후 retinol의 혈장중 약물농도 추이의 속도론적 해석

정맥주사후의 retinol 혈장중 농도-시간 데이터를 다음과 같은 전형적인 선형 2-컴파트먼트 모델에 따라 속도론적으로 해석하였다.

$$C = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t} \quad (1)$$

정맥투여후 얻어진 혈장중 농도 - 시간 데이터를 (1)식에 비선형최소자승법으로 피팅(fitting)하여 각 파라미터를 산출하였다. 기타 속도론적 파라미터를 구하는 식은 다음과 같다.

$$k_{21} = (A\beta + B\alpha)/(A+B)$$

$$k_{el} = \alpha\beta/k_{21}$$

$$k_{12} = (\alpha + \beta) - (k_{12} + k_{el})$$

$$t_{1/2\alpha} = 0.693/\alpha$$

$$t_{1/2\beta} = 0.693/\beta$$

경피투여한 후 retinol의 혈장중 약물농도 추이의 속도론적 해석

Retinol을 경피투여한 후 얻어진 혈장중 농도-시간 데이터를 다음과 같은 흡수부위를 가정한 선형 2-컴파트먼트모델에 따라 속도론적으로 해석하였다.

$$C = \frac{k_a FD(k_{21} - k_a)}{V_{dl}(\alpha - k_a)(\beta - k_a)} e^{-k_a t} + \frac{k_a FD(k_{21} - \alpha)}{V_{dl}(k_a - \alpha)(\beta - \alpha)} e^{-\alpha t} + \frac{k_a FD(k_{21} - \beta)}{V_{dl}(k_a - \beta)(\alpha - \beta)} e^{-\beta t} \quad (2)$$

여기서 k_a 는 흡수속도정수 (min^{-1})를, X_a 는 흡수부위에서의 약물량($\mu\text{g/ml}$)을 나타낸다. 경피투여후 얻어진 혈장중 농도-시간 데이터를 (2)식에 비선형최소자승법으로 피팅(fitting)하여 k_a 를 산출하였다.

모델 비의존적 해석

약물의 흡수과정이 존재하는 경우, 특히 retinol의 경피투여후에는 혈중농도가 장시간 유지되며 흡수가 지속적으로 일어날 것으로 추정된다. 또한 흡수부위를 가정한 선형-컴파트먼트모델로 해석한 파라미터들은 큰 오차를 발생할 수 있다. 따라서 retinol의 경피제 투여후의 혈장중 농도-시간 데이터로부터 다음과 같이 흡수율(생체이용률)을 포함한 모델 비의존적 파라미터들을 산출하여 평가하였다.

$$AUC = \int_0^{\infty} C dt \quad (3)$$

$$AUMC = \int_0^{\infty} t \cdot C dt \quad (4)$$

$$MRT = \frac{AUMC}{AUC} \quad (5)$$

$$CL_t = \frac{F \cdot DOSE}{AUC} \quad (6)$$

$$V_{dss} = CL_t \cdot MRT \quad (7)$$

$$BA = \frac{AUC_{td}}{AUC_{iv}} \times 100 (\%) \quad (8)$$

여기서 AUC 및 AUMC는 사다리꼴면적공식으로 산출하였으며, MRT는 평균체류시간, CL_t 는 전신 클리어런스, V_{dss} 는 정상상태 분포용적을 각각 나타낸다. 또한, BA는 절대생체이용률을 나타내며, 흡수율(F)은 BA의 값에서 백분율을 환산하여 산출하였다.

결과 및 고찰

혈장 및 피부조직중 retinol의 HPLC 분석법 확립

현재 보고되어 있는 생체시료중 retinol 분석방법^{1,12-16}을 종합적으로 검토하여, 본 연구에서의 최적조건을 확립하였다. 본 연구에서 확립한 gradient 조건에서 retinol의 분리성, 정량성이 양호함을 확인하였다(Figure 1). 내부표준물질(retinyl acetate)을 methanol에 용해시켜 주입하였을 때, 내부표준물질이외의 피크는 출현하지 않았다(Figure 1(A)). 그러나, 혈장중에는 내인성의 retinol이 존재하며, 실제로 내부표준물질만을 가한 blank 혈장에서 내인성 retinol의 피크가 출현하였다(Figure 1(B), upper panel). 따라서 혈장중 retinol의 정량시에는 내인성의 retinol blank값을 보정하였다. 혈장중 retinol의 검량선은 0.1-20.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도범위에 걸쳐 양호한 직선성($r=0.999$)을 나타내었다.

한편, 피부조직중에는 내인성 retinol의 피크가 혈장의 경우에 비해 작게 나타났었다(Figure 1(B), lower panel). 혈장에서처럼 내인성 retinol의 양을 보정하여 피부조직중 retinol의 검량선을 작성한 결과, 혈장의 검량선과 유의한 차이를 나타내지 않았다.

정맥주사 후 혈장중 retinol 농도 패턴에 대한 속도론적 해석

Retinol 4.32 mg/kg의 용량으로 정맥주사한 후 혈장중 소실을 측정하였다(Figure 2). 또한, 혈장중 농도-시간곡선을 비선형최소자승법 또는 모델 비의존적 해석방법으로 각 파라미터를 산출하였다(Table II). 초기 혈장중 농도는 약 20 μg

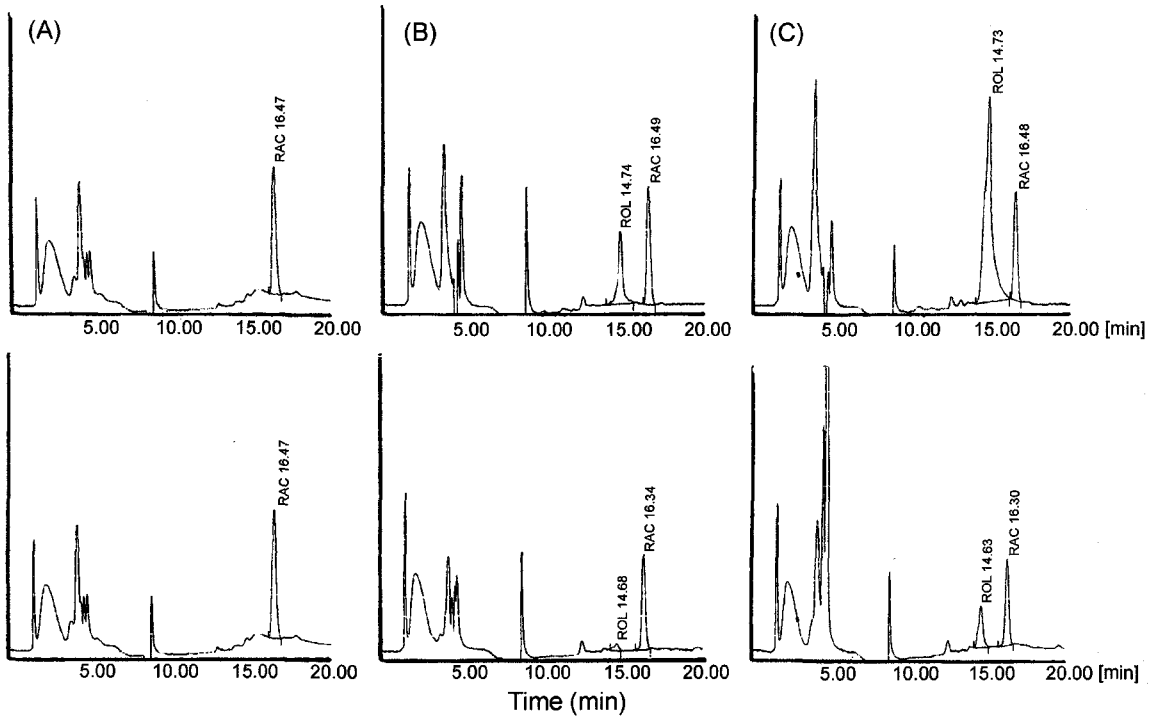


Figure 1—Typical high performance liquid chromatograms of retinol (ROL) and retinyl acetate (RAC) as an internal standard (IS). Upper panel represents the chromatograms of plasma, and lower panel represents the chromatograms of skin. Key: (A) Metanol solution (+IS), (B) Blank (+IS), (C) A sample after the administration of retinol.

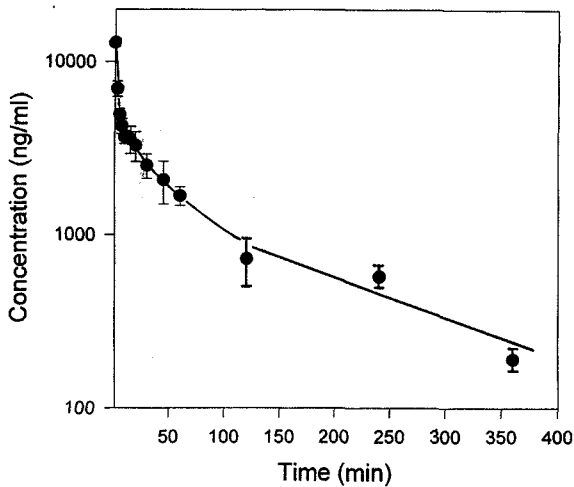


Figure 2—Plasma disappearance of retinol after its i.v. bolus administration at the dose of 4.32 mg/kg. Each point represents the mean \pm S.E. (n=3).

Table II—Pharmacokinetic Parameters of Retinol after its i.v. Administration (4.32 mg/kg) in the Rat*

| Parameter | Mean \pm S.E. |
|--|-------------------|
| A ($\mu\text{g/ml}$) | 15.2 \pm 0.680 |
| B ($\mu\text{g/ml}$) | 4.21 \pm 0.604 |
| α (min^{-1}) | 0.551 \pm 0.058 |
| β (min^{-1}) | 0.012 \pm 0.002 |
| k_{12} (min^{-1}) | 0.384 \pm 0.043 |
| k_{21} (min^{-1}) | 0.128 \pm 0.020 |
| k_{el} (min^{-1}) | 0.052 \pm 0.005 |
| $t_{1/2\alpha}$ (min) | 1.30 \pm 0.151 |
| $t_{1/2\beta}$ (min) | 62.8 \pm 11.8 |
| AUC ($\mu\text{g} \cdot \text{min} \cdot \text{ml}^{-1}$) | 428 \pm 8.84 |
| AUMC ($\text{mg} \cdot \text{min}^2 \cdot \text{ml}^{-1}$) | 42.9 \pm 16.5 |
| MRT (min) | 115 \pm 4.53 |
| CL_t (ml/min) | 9.35 \pm 0.194 |
| Vdss (l/kg) | 1.07 \pm 0.056 |

* Each value represents the mean \pm S.E. (n=3).

ml의 비교적 높은 값을 나타내었다. 분포전상(α 상)에서의 반감기($t_{1/2\alpha}$)는 1.3분으로 신속히 소실된 후, 분포후상(β 상)에서의 소실은 느리게 나타났다. Retinol은 혈중으로부터 지용성으로 인해 용이하게 조직으로 분포되기 때문이라고 생각되었다. 한편 retinol의 소실은 느린 것으로 생각된다. 혈장 컴

파트먼트로부터 조직 컴파트먼트로의 이행을 나타내는 속도정수(k_{21})의 값이 소실 속도정수(k_{el})에 비해 상대적으로 높고, 전신 클리어런스(CL_t)가 낮은 값을 보인 사실은 이러한 결과를 지지해 주고 있다.

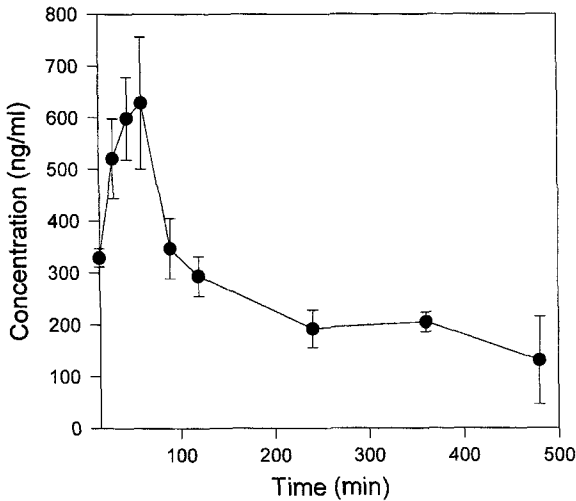


Figure 3—Plasma concentration-time profile of retinol after its transdermal administration at the dose of 43.2 mg/kg. Each point represents the mean \pm S.E. (n=3).

Table III—Pharmacokinetic Parameters of Retinol after its Transdermal Administration (43.2 mg/kg) in the Rat*

| Parameter | Mean \pm S.E. |
|---|-------------------|
| C_{max} ($\mu\text{g/ml}$) | 0.775 \pm 0.04 |
| t_{max} (min) | 45 \pm 7.07 |
| k_a (min^{-1}) | 0.079 \pm 0.037 |
| AUC ($\mu\text{g} \cdot \text{min} \cdot \text{ml}^{-1}$) | 121.8 \pm 11.4 |
| AUMC ($\text{g} \cdot \text{min}^2 \cdot \text{ml}^{-1}$) | 24.8 \pm 3.07 |
| MRT (min) | 202 \pm 15.7 |
| CL_r (ml/min) | 336 \pm 29.7 |
| Vdss (l/kg) | 67.7 \pm 6.80 |
| BA (%) | 2.85 \pm 0.26 |

* Each value represents the mean \pm S.E. (n=3)

경피투여 후 혈장중 retinol 농도 패턴에 대한 속도론적 해석

Retinol 43.2 mg/kg의 용량으로 경피투여한 후 retinol의 혈장중 농도를 측정하였다(Figure 3). 혈장중 농도-시간곡선을 비선형최소자승법 또는 모델비의존적 해석방법으로 각 파라미터를 산출하였다(Table III). 경피 투여량은 정맥투여시의 10배임에도 불구하고 최대 혈장중 농도(C_{max})는 낮은 값(776 ng/ml)을 보였다. 한편, C_{max} 출현시간인 t_{max} 는 45분으로 나타났으며 혈장중농도는 8시간까지 지속되었다. 혈장중 농도 곡선하면적(AUC)을 정맥투여시의 AUC와 비교하여 산출한 생체이용률은 2.85%의 낮은 값을 보였다. 즉, retinol의 고용량(43.2 mg/kg)을 경피에 적용시에는 혈중으로 이행되는 비율은 3% 이하임을 나타낸다. 이러한 결과는, retinoic acid를 경피로 적용하였을 때 혈중으로 거의 이행되

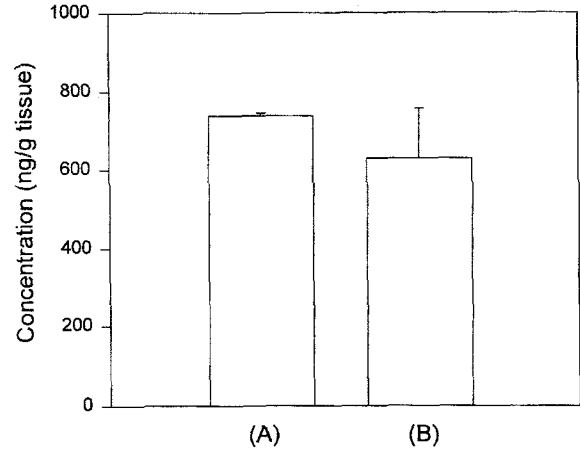


Figure 4—Skin distribution of retinol after its transdermal administration at the dose of 43.2 mg/kg. Each bar represents the mean \pm S.E. (n=3).

Key: (A) Skin concentration (12hr) and (B) Maximum plasma concentration (C_{max})

지 않는다는 보고⁴⁾를 고려하면 매우 긍정적인 결과로 생각된다.

경피투여 후 피부중 retinol 농도 패턴

Retinol 43.2 mg/kg의 용량으로 경피투여한 다음, 12시간 후의 피부조직중 retinol의 농도를 측정하였다(Figure 4). 경피제제를 피부에 적용한 후 혈액 채취가 끝나는 시점인 12시간에 피부를 적출하여 측정된 피부조직중 retinol 농도는 600 ng/g tissue로서 최대 혈장중 농도(776 ng/ml; Figure 2)와 유사한 값을 나타내었다.

이상의 결과를 종합하여 고찰하면, retinol의 경피투여시에는 피부조직중 일정 농도(600 ng/g tissue)를 유지하며, 혈중으로 이행되어 투여초기에는 피부조직중 농도와 유사한 혈장중 농도를 나타내나 시간이 경과함에 따라 retinol의 조직이행성이 크기 때문에 혈장중 농도는 감소되는 것으로 생각된다.

결론

1. 생체시료중 retinol분석방법을 종합적으로 검토하여, 본 연구에서 최적조건을 확립하였다. 본 연구에서 확립한 조건에서 retinol의 분리성, 정량성이 양호함을 확인하였으며, 혈장중 및 피부조직중 retinol의 검량선은 넓은 농도범위에 걸쳐 양호한 직선성을 나타내었다.
2. Retinol 4.32 mg/kg의 용량으로 정맥주사한 후의 초기 혈장중 농도는 약 20 $\mu\text{g/ml}$ 의 비교적 높은 값을 나타내었다. 분포전상(α 상)에서의 반감기($t_{1/2\alpha}$)는 1.3분으로 신속히 소

실된 후, 분포후상(β상)에서의 소실은 느리게 나타났다.

3. Retinol 43.2 mg/kg의 용량으로 경피투여한 후, 최대 혈장중 농도(C_{max})는 낮은 값(776 ng/ml)을 보였으며, 생체이용률은 2.85%의 낮은 값을 보였다.

4. Retinol 43.2 mg/kg의 용량으로 경피투여한 다음, 12시간 후의 피부중 retinol의 농도는 600 ng/g tissue로서 최대 혈장중 농도(776 ng/ml)와 유사한 값을 나타내었다.

5. 이상의 결과를 종합하면, retinol의 경피투여시에는 피부조직중 일정 농도(600 ng/g tissue)를 유지하며, 혈중으로 이행되어 투여초기에는 피부조직중 농도와 유사한 혈장중 농도를 나타내나 시간이 경과함에 따라 감소되는 것으로 추정되었다.

감사의 말씀

이 연구는 충북대학교지방대학특성화사업(보건의료생명과학) 제2차 산학협력연구 지원(1998)을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) R. Ruhl and H. Nau, Determination of adapalene (CD271/Differin®) and retinol in plasma and tissue by on-line solid-phase extraction and HPLC analysis, *Chromatographia*, **45**, 269-274 (1997)
- 2) E.A. Duell, F. Derguini, S. Kang, J.T. Elder and J.J. Voorhees, Extraction of human epidermis treated with retinol yields retro-retinoids in addition to free retinol and retinyl esters, *J. Invest. Dermatol.*, **107**, 178-182 (1996)
- 3) B. Berne, M. Nilsson and A. Vahl. Quist, Uv irradiation and cutaneous vitamin A: an experimental study in rabbit and human skin, *J. Invest. Dermatol.*, **83**, 401-404 (1984)
- 4) V. Masini, F. Bonte, A. Meybeck and J. Wepierre, Cutaneous bioavailability in hairless rats of tretinoin in liposomes or gel, *J. Pharm. Sci.*, **82**, 17-21 (1993).
- 5) E.G. Thome, Long-term clinical experience with a topical retinoid, *British J. Dermatol.*, **127(Suppl.)**, 41, 31-36 (1992).
- 6) S. Kang, E.A. Duell, G.J. Fisher, S.C. Datta, Z.-Q. Wang, A.P. Reddy, A. Tavakkol, J.Y. Yi, C.E.M. Griffiths, J.T. Elder and J.J. Voorhees, Application of retinol to human skin in vivo induces epidermal hyperplasia and cellular retinoid binding proteins characteristic of retinoic acid but without measurable retinoic acid levels or rotation, *J. Invest. Dermatol.*, **105**, 549-556 (1995).
- 7) E.A. Duell, S. Kang and J.J. Voorhees, Retinoic acid isomers applied to human skin in vivo each induce a 4-hydroxylase that inactivates only trans retinoic acid, *J. Invest. Dermatol.*, **106**, 316-320 (1996).
- 8) A. Vahlquist, E. Andersson, B.-I. Coble, O. Pollman and H. Torma, Increased concentrations of 3,4-didehydroretinol and retinoic acid-binding protein (CRABPII) in Human squamous cell carcinoma and keratoacanthoma but not in basal cell carcinoma of the skin, *J. Invest. Dermatol.*, **106**, 1070-1074 (1996).
- 9) S.E. Dew and D.E. Ong, Absorption of retinol from the retinol:retinol-binding protein complex by small intestinal gut sheets from the rat, *Arch. Biochem. Biophys.*, **338**, 233-236 (1997).
- 10) E.A. Tembe, R. Honeywell, N.E. Buss and A.G. Renwick, All-trans-retinoic acid in maternal plasma and teratogenicity in rats and rabbits, *Toxicol. Applied Pharmacol.*, **141**, 456-472 (1996).
- 11) P. Buchan, C. Eckhoff, D. Caron, H. Nau, B. Shroot and H. Schaefer, Repeated topical administration of all-trans-retinoic acid and plasma levels of retinoic acids in humans, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **30**, 428-433(1994)
- 12) A.B. Barua, D. Kostic, M. Barua and J.A. Olson, Determination of retinol and retinoic acid in capillary blood by high performance liquid chromatography, *J. Liq. Chromato.*, **18**, 1495-1471 (1995)
- 13) C. Eckhoff and H. Nau, Identification and quantitation of all-trans- and 13-cis-retinoic acid and 13-cis-4-oxoretinoic acid in human plasma, *J. Lipid. Research*, **31**, 1445-1454 (1990)
- 14) S. Asami, M. Takamura, Y. Kimura, T. Suzuki, H. Mugishima and K. Uchikura, Continuous measurement of retinoic acid isomers and retinol in a plasma by column-switching reversed-phase HPLC, *Bunseki Kagaku*, **36**, 943-950 (1997).
- 15) A. Vahlquist, Vitamin A in human skin: I. Detection and identification of retinoids in normal Epidermis, *J. Invest. Dermatol.*, **79**, 89-93 (1982).
- 16) C. Eckhoff, M.D. Collins and H. Nau, Human plasma all-trans, 13-cis- and 13-cis-4-oxoretinoic acid profiles during sub-chronic vitamin A supplementation: Comparison to retinol and retinyl ester plasma levels, *J. Nutr.*, **121**, 1016-1025 (1991).