

双波长分光光度法同时测定载硫酸长春新碱/姜黄素聚合物纳米粒中两种药物的含量^①

王海鸥^{a,b} 袁佩^b 滕永真^b 贾运涛^c 张良珂^{②a,b}

^a(重庆医科大学药学院 重庆市生物化学与分子药理学重点实验室 重庆市 400016)

^b(重庆医科大学生命科学院 重庆市 400016)

^c(重庆医科大学附属儿童医院药剂科 重庆市 400010)

摘要 以聚乙二醇单甲醚-聚乳酸-乙醇酸共聚物(mPEG-PLGA)为载体材料,制备同时载带硫酸长春新碱(VCR)和与之具有协同抗肿瘤作用的姜黄素(Cur)的mPEG-PLGA纳米粒(VCR/Cur-mPEG-PLGA-NP)。建立了以等吸收双波长紫外分光光度法同时测定纳米粒中VCR和Cur含量的方法,研究显示,VCR测定波长296.5nm,等吸收波长462nm;Cur测定波长414nm;VCR在4.0—36.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内,浓度C与差值吸光度 ΔA 呈良好线性相关;Cur在0.5—8.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内,浓度C与吸光度A具有良好的线性关系。该方法简便迅速,结果准确可靠,适用于VCR/Cur-mPEG-PLGA-NP中药物含量的同时测定。

关键词 双波长;紫外分光光度法;姜黄素;硫酸长春新碱

中图分类号:O657.32

文献标识码:A

文章编号:1004-8138(2011)06-2820-05

1 引言

肿瘤细胞的多药耐药性(Multidrug resistance, MDR)是临床肿瘤治疗失败的主要原因。肿瘤细胞内存在过表达的P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp),P-gp不仅可介导细胞内药物外排增加,还能抑制细胞凋亡信号的传导,与肿瘤细胞MDR机制密切相关^[1]。姜黄素(Curcumin, Cur)是从姜科姜黄属植物姜黄、莪术、郁金等的根茎中提取出的一种天然有效成分。研究表明^[2],姜黄素可有效抑制肿瘤细胞P-gp的功能及其表达,逆转肿瘤细胞MDR表型。硫酸长春新碱(Vincristine Sulfate, VCR)是临床常用的细胞周期特异性抗肿瘤药物,但其同时也是P-gp的转运底物之一^[3]。VCR与Cur联用,可有效增加VCR的肿瘤细胞内蓄积浓度,增强VCR的细胞毒性作用,将有望成为临床肿瘤治疗的一种新型有效途径^[4]。

本文以聚乙二醇单甲醚-聚乳酸-乙醇酸共聚物[Monomethoxy poly(ethylene glycol)-poly(lactide-co-glycolide), mPEG-PLGA]为载体材料,制备了同时载带VCR和Cur的聚合物纳米粒(mPEG-PLGA nanoparticles simultaneously loaded with vincristine sulfate and curcumin, VCR/Cur-mPEG-PLGA-NP)。在药物制剂的前期制备阶段,往往需要将不同制剂处方中药物含量

① 国家自然科学基金项目(30770565);重庆市科委自然科学基金资助项目(CSTC, 2008BB5397);重庆市渝中区科技计划项目资助(20100203);重庆市卫生局课题资助(2010-2-202)

② 联系人,手机:(0)13896187219;电话:(023)68485078;E-mail:zlkdyx@126.com;地址:重庆市渝中区医学院路1号重庆医科大学药学院193信箱,400016

作者简介:王海鸥(1986—),男(布依族),贵州省兴义市人,硕士,主要从事新型药物传输系统研究工作。

张良珂(1974—),男,河北省保定市人,教授,博士,主要从事中西药物新型给药系统研究工作。

的信息及时回馈给研究者, 以便实时调整配方达到最优。对类似的同时载带两种具有协同作用的药物的纳米粒中药物含量测定, 已有的文献报道多采用高效液相色谱法^[5], 但该方法操作较繁琐, 工作量较大, 信息反馈较为滞后。

本文拟采用紫外分光光度法分别测定纳米粒中 VCR 和 Cur 的含量, 但 Cur 在 VCR 的测定波长下亦有较强吸收, 对 VCR 的测定结果影响较大。因此, 本文建立了以等吸收双波长紫外分光光度法同时测定 VCR/Cur-mPEG-PLGA-NP 中 VCR 和 Cur 含量的方法, 消除了 Cur 对 VCR 测定的干扰, 简化了工作程序, 降低了工作量, 实现了对 VCR/Cur-mPEG-PLGA-NP 中药物含量的快速准确控制。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

A200s 分析天平(德国 Sartorius 公司); UV-3150 紫外可见分光光度仪(日本岛津公司)。

硫酸长春新碱(Mw 923.04, 纯度 99%, 广州环叶制药有限公司); 姜黄素(Mw 368.39, 纯度 $\geq 98\%$, 浙江省温州市东升试剂厂); 其余试剂均为分析纯。实验用水为蒸馏水。

2.2 VCR/Cur-mPEG-PLGA-NP 的制备

采用 O/W 乳化溶剂挥发法制备 VCR/Cur-mPEG-PLGA-NP, 取适量 VCR, Cur 与 mPEG-PLGA 溶于 1mL 二氯甲烷-丙酮混合溶剂(2:1, V/V) 中, 作油相(O); 3mL PVA 水溶液(1%, W/V) 作水相(W); 混合油水两相, 冰浴下探头超声成乳(1000000J, 30s), 所得 O/W 乳液以 5mL PVA 水溶液(0.5%, W/V) 稀释, 减压挥干有机溶剂, 超速冷冻离心 30min(14000r \cdot min⁻¹), 沉积物用蒸馏水洗涤后, 真空冷冻干燥, 即得 VCR/Cur-mPEG-PLGA-NP。

3 结果与讨论

3.1 测定波长的选择

各取适量 Cur、VCR、mPEG-PLGA 溶于乙腈中, 以乙腈为空白, 分别在 600—200nm 波长范围内进行扫描, 绘制紫外吸收图谱(图 1)。

由图 1 可知, Cur 在 414nm 附近有最大吸收, VCR 在此处基本无吸收; VCR 在 296.5nm 附近有最大吸收, 但 Cur 在此处的吸收亦较强; mPEG-PLGA 在上述两处波长附近基本无吸收。分析 Cur 的紫外吸收图谱, 发现在 296.5nm 和 462nm 处, Cur 的吸收强度相等, 亦即 296.5nm 和 462nm 是 Cur 的两个等吸收点。因此, 根据等吸收法原理, 在 296.5nm 和 462nm 处分别测定载 Cur/VCR 聚合物纳米粒样品溶液的吸光度值, 二者相减, 即得 VCR 在 296.5nm 处的真实吸光度值, 而对 Cur 的含量测定无影响。

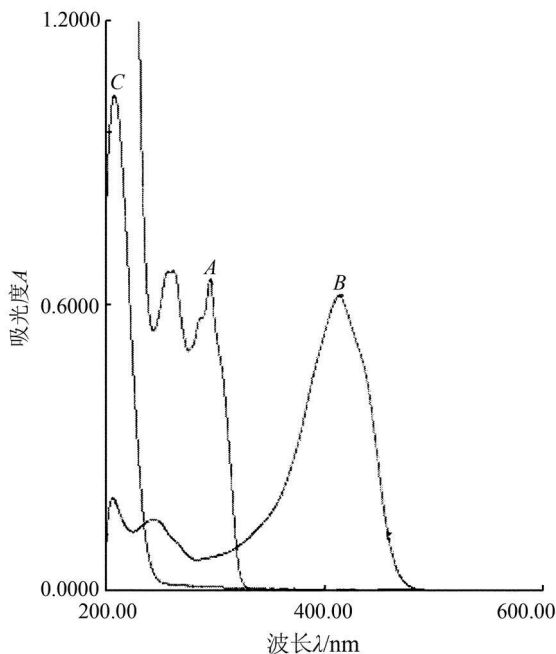


图 1 VCR、Cur 和 mPEG-PLGA 的紫外吸收图谱

A——VCR; B——Cur; C——mPEG-PLGA。

3.2 校准曲线的绘制

3.2.1 Cur 校准曲线的绘制

准确称取 Cur 10.0mg 溶于适量乙腈,再用乙腈定容至 50mL 容量瓶中,即得浓度为 $200\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 Cur 标准溶液。准确移取 Cur 标准溶液,分别稀释成 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 Cur 溶液,在 414nm 处以乙腈为空白测定吸光度,以吸光度值(A)对 Cur 质量浓度(C)作线性回归,得回归方程 $A = 0.1484C + 0.0177$ ($r = 0.9998$),说明在 0.5—8.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内 Cur 质量浓度 C 与吸光度 A 呈良好的线性关系。

3.2.2 VCR 校准曲线的绘制

准确称取 VCR 10.0mg 溶于适量乙腈,再用乙腈定容于 25mL 容量瓶中,即得浓度为 $400\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 VCR 标准溶液,准确移取 VCR 标准溶液,分别稀释成 4.0、8.0、16.0、24.0、32.0、36.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 VCR 溶液,在 5.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 Cur 溶液中分别加入上述不同浓度的 VCR 溶液,以乙腈为空白,分别测定其在 296.5nm 处的吸光度值($A_{296.5}$)和 462nm 处的吸光度值(A_{462}),以二者差值(ΔA)对 VCR 质量浓度(C)作线性回归,得回归方程 $\Delta A = 0.0134C - 0.0053$ ($r = 0.9997$),说明在 4.0—36.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内 VCR 质量浓度 C 与差值吸光度 ΔA 呈良好的线性关系。

3.3 方法回收率及精密度考察

取空白 mPEG-PLGA-NP,加入 VCR/Cur 标准溶液,配制为含 Cur、VCR 依次为 1.00、4.70 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 5.20、23.50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 8.10、36.60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 3 个浓度水平的混合溶液,以乙腈为空白,分别在 296.5、462、414nm 处测定其吸光度(A),以 A_{414} 代入 Cur 的校准曲线方程,即得 Cur 浓度;以 $A_{296.5}$ 与 A_{462} 之差 ΔA 代入 VCR 校准曲线方程,即得 VCR 浓度。每浓度水平一天测 5 次,隔天测一次,连续测 5 天,分别计算 Cur 和 VCR 的回收率及精密度。结果见表 1、表 2。

表 1 硫酸长春新碱测定的精密度和回收率

理论浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	日内($n=5$)			日间($n=5$)		
	实测浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	回收率 (%)	RSD (%)	实测浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	回收率 (%)	RSD (%)
4.70	4.75±0.04	101.1	0.84	4.71±0.04	100.2	0.85
23.50	23.58±0.11	100.3	0.47	23.53±0.13	100.1	0.55
34.60	34.52±0.17	99.8	0.49	34.59±0.16	100.0	0.46

由表 1 可知,在高、中、低 3 个浓度水平,VCR 的回收率为 99.8%—101.1%,平均回收率 100.2%,结果满意。

表 2 姜黄素测定的精密度和回收率

理论浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	日内($n=5$)			日间($n=5$)		
	实测浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	回收率 (%)	RSD (%)	实测浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	回收率 (%)	RSD (%)
1.00	0.99±0.00	99.0	0.00	1.00±0.01	100.0	1.00
5.20	5.19±0.01	99.8	0.19	5.20±0.01	100.0	0.19
8.10	8.19±0.01	101.1	0.12	8.18±0.02	101.0	0.24

由表 2 可知, Cur 的回收率为 99.0%—101.1%,平均回收率 100.2%,回收率较高。

3.4 样品中药物的含量测定

在不同批次制备的 VCR/Cur-mPEG-PLGA-NP 中,随机抽取 3 个批次的聚合物纳米粒样品各 3.0mg,溶于 10mL 乙腈。按 3.3 项下方法分别测定纳米粒中 Cur 和 VCR 的浓度,每批次样品分别

测定 3 次。按下式计算纳米粒中的药物含量:

$$\text{药物含量} = (\text{药物浓度} \times \text{乙腈体积} / \text{纳米粒总质量}) \times 100\%。$$

结果见表 3。

表 3 样品测定结果

批号	VCR 含量 ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$)	Cur 含量 ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$)	VCR 含量 RSD (%)	Cur 含量 RSD (%)
20101119	7.39	17.89		
20101121	7.53	18.08	0.94	0.54
20101122	7.45	17.95		

4 结论

本文将姜黄素与硫酸长春新碱联合包载于 mPEG-PLGA 纳米粒中, 充分利用 mPEG-PLGA 纳米粒的粒径较小、可生物降解等优势, 以硫酸长春新碱作为主要的细胞毒性药物, 以姜黄素作为逆转剂, 构建细胞毒药物与中药逆转剂联用的聚合物纳米粒传输系统模型。本文采用等吸收双波长紫外分光光度法, 间接消除了纳米粒中的主药 Cur 对另一主药 VCR 测定的干扰, 同时不影响对 Cur 含量的测定。在高、中、低 3 个浓度水平, VCR 和 Cur 的回收率均接近 100%, 测定精密度较高, 测得样品中 VCR、Cur 的平均含量分别为 7.46 ± 0.07 , $17.97 \pm 0.10 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。该方法无需对样品作特殊处理, 乙腈溶解后即可直接进行紫外测定, 操作简便迅捷, 测定结果准确可靠, 重现性较好, 实现了对 VCR/Cur-mPEG-PLGA-NP 中两种药物含量的快速测定。

参考文献

- [1] Baguley B C. Multiple Drug Resistance Mechanisms in Cancer[J]. *Molecular Biotechnology*, 2010, **46**(3): 308—316.
- [2] Angelini A, Lezzi M, Di Febbo C *et al.* Reversal of P-Glycoprotein-Mediated Multidrug Resistance in Human Sarcoma M ES-SA/Dx-5 Cells by Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs[J]. *Oncology Reports*, 2008, **20**(4): 731—735.
- [3] Bohacova V, Sulova Z, Dovinova I *et al.* L1210 Cells Cultivated Under the Selection Pressure of Doxorubicin or Vincristine Express Common Mechanisms of Multidrug Resistance Based on the Overexpression of P-Glycoprotein[J]. *Toxicol In Vitro*, 2006, **20**(8): 1560—1568.
- [4] Song X R, Zheng Y, He G *et al.* Development of PLGA Nanoparticles Simultaneously Loaded with Vincristine and Verapamil for Treatment of Hepatocellular Carcinoma[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010, **99**(12): 4874—4879.
- [5] Song X, Zhao Y, Hou S *et al.* Dual Agents Loaded PLGA Nanoparticles: Systematic Study of Particle Size and Drug Entrapment Efficiency[J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2008, **69**(2): 445—453.

Simultaneous Determination of the Two Drugs in Polymeric Nanoparticles Loaded with Vincristine Sulfate and Curcumin by Dual-Wavelength Spectrophotometry

WANG Hai-Ou^{a,b} YUAN Pei^b TENG Yong-Zhen^b JIA Yun-Tao^c ZHANG Liang-Ke^{a,b}

^a(School of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, P. R. China)

^b(Institute of Life Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, P. R. China)

^c(Department of Pharmacy, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, P. R. China)

Abstract mPEG-PLGA nanoparticles simultaneously loaded with vincristine sulfate (VCR) and curcumin (Cur) were prepared with polyethylene glycol monomethyl ether-poly(lactic acid-glycolic acid)

copolymer (mPEG-PLGA) as carrier material. Dual-wavelength ultraviolet spectrophotometry was employed for measuring the content of the dual agent (VCR and Cur) in VCR/Cur-mPEG-PLGA-NP. The results showed that 296.5 nm and 462 nm were the maximum absorption wavelength and isosbestic wavelength of VCR respectively, and 414 nm was the maximum absorption wavelength of Cur. Good linear correlations between the content of drug and absorbance were found in the range of 4.0—36.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ for VCR and 0.5—8.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ for Cur. In conclusion, a simple, accurate and sensitive method was established to simultaneously determine the content of VCR/Cur-mPEG-PLGA-NP.

Key words Dual-Wavelength; Ultraviolet Spectrophotometry; Curcumin; Vincristine Sulfate

穷酸的西南联大与 3 位诺贝尔奖得主 ——真正意义上的世界一流大学

西南联大的历史,前后不过 8 年半(1937 年 9 月至 1946 年 5 月)。当年的物质条件可够穷酸的:学生宿舍无一砖一瓦,全是夯黄土为墙,堆茅草为顶,窗户没有一块玻璃,仅有几根树枝聊以象征。绝大多数师生经常是食不果腹,衣不蔽体,不时还要在敌机轰炸下逃生。在校学生不超过 2000。可是当年的西南联大,在三不管的地方,坚守大学理想,主张“教授是大学的灵魂”,实行“不妄用一钱,不妄用一人”;教师为爱国而教,学生为救国而学,吃红薯干,点桐油灯,以苦为乐;励精图治,弦歌不辍;为人师表,一身正气;人格独立,不党不官;不亢不卑,敢于批判;沉潜专注,甘于寂寞。一言以蔽之,“五·四”运动所倡导的“科学和民主”精神之传承与发扬光大也!因此,培养出 3 位诺贝尔奖得主——杨振宁和李政道,另一位则是朱棣文(其父朱汝瑾是联大助教,其姑朱汝华是教授——曾昭抡的得意门生)。

拥有国家一流的教授阵容;运行一套“思想自由,兼容并包”、纯粹研究学问的办学理念;推行一种通才教育的培养目标;有一位深孚众望的校长——这些因素奠定了西南联大堪称世界一流大学的基础。

西南联大身后的三校(北大、清华和南开),当今在校学生总数当在 60000—70000 之间,相当于当年的 30 多倍,三校校园内高楼大厦林立,与当年西南联大的茅屋草舍相比,真是天壤之别。所耗费的资金当在西南联大的数百倍以上。三校的年寿,从 1950 年算起,已有 59 年,若从改革开放算起,亦有 30 年,为当年西南联大寿命的 4 倍至 5 倍。以人力、财力和时间来看,都是当年西南联大无法望其项背的。以如此优越的条件和实力,却培养不出世界一流杰出的人才——60 年来无 1 人获得诺贝尔奖,其故安在!?

清华大学 1 位教授在美国访问时发现,世界一流的哈佛大学大门,却是十分古旧俭朴的:拱型的门洞是用红砖砌的,中间是铁制的大门,门框上面是三角形的尖顶。两边的围墙也是红砖砌的,中间是陈旧的铁制护栏。但是而今中国学校的大门,甭说大学,就是一些重点中学的校门,也比哈佛大学的壮观。在一些国人看来,似乎要成为世界一流大学、一流中学就在于校门以及办公大楼的气派和壮观!?

我国是世界最大的发展中国家(最大的穷国),美国是世界最大的发达国家(最大的富国)。这位清华大学教授还看到在这世界最大的富国中,名牌大学的办公大楼和办公家具仍是俭朴的:楼房大多是 3 层的,上个世纪的转盘电话和用过多年的木制家具还在使用。而在我们这个世界最大的穷国中的某些名牌大学,转盘电话和古朴的木制家具早已(淘汰)不见踪影!仿佛这些“过时”的东西,与名牌大学的“身份”太不相称了吧!。

清华大学前校长梅贻琦说过:“失学者,非谓有大楼之谓也,有大师之谓也”。靠浮华的“形象工程”能建成世界一流名牌大学吗?

早在两千多年前,古希腊哲学大师亚里士多德就说过,产生杰出的思想家和杰出发明家需要三个条件:一是对学问有真正的兴趣,二是有充分的思想自由,三是有充足的闲暇时间。

北京大学前校长蔡元培说过,“失学并不是贩卖毕业证的机关,也不是灌输固定知识的机关,而是研究学问的机关。所以,大学的学生并不是熬资格,也不是硬记教员讲义,是在教员指导之下自动地研究学问的。”“尤当养成学问家之人格”。“所以延聘教员,不但是求有学问的,还要求于学问上很有研究的兴趣,并能引起学生的研究兴趣的。”

这些学术大师是许多人、甚至一些大人物推崇备至的,但其办学理念在现实中却常弃之如敝履,也许正是我们需要深刻反思的。(2011-05-06)

(本刊摘编自《随笔》杂志 2008 年第 2 期何兆武《关于诺贝尔奖情节》等文)