

- gy, 2013, 87(3): 306–322
- 11 Koprivnikar JL, Cheson BD. Bortezomib: a proteasome inhibitor with an evolving role in select subtypes of B–cell non–Hodgkin's lymphoma [J]. *Future Oncol*, 2012, 8(4): 359–371
- 12 Barr PM, Fu P, Lazarus HM, *et al.* Phase I trial of fludarabine, bortezomib and rituximab for relapsed and refractory indolent and mantle cell non–Hodgkin lymphoma [J]. *British Journal of Hematology*, 2009, 147(1): 89–96
- 13 Goy A, Younes A, McLaughlin P, *et al.* Phase II study of proteasome inhibitor bortezomib in relapsed or refractory B–cell non–Hodgkin's lymphoma [J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2005, 23(4): 667–675
- 14 Fisher RI, Bernstein SH, Kahl BS, *et al.* Multicenter phase II study of bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma [J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2006, 24(30): 4867–4874
- 15 Gerecitano J, Portlock C, Hamlin P, *et al.* Phase I trial of weekly and twice–weekly bortezomib with rituximab, cyclophosphamide, and prednisone in relapsed or refractory non–Hodgkin lymphoma [J]. *Clinical Cancer Research*, 2011, 17(8): 2493–2501
- 16 Ruan J, Martin P, Furman R R, *et al.* Bortezomib plus CHOP–rituximab for previously untreated diffuse large B–cell lymphoma and mantle cell lymphoma [J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2011, 29(6): 690–697
- 17 Oakervee H, Popat R, Cavenagh JD. Use of bortezomib as induction therapy prior to stem cell transplantation in frontline treatment of multiple myeloma: impact on stem cell harvesting and engraftment [J]. *Leukemia Lymphoma*, 2007, 48(10): 1910–1921
- 18 Gutierrez M, Chabner BA, Pearson D, *et al.* Role of a doxorubicin–containing regimen in relapsed and resistant lymphomas: an 8–year follow–up study of EPOCH [J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2000, 18(21): 3633–3642
- 19 Wilder DD, Ogden JL, Jain VK. A multicenter trial of infusional etoposide, doxorubicin, and vincristine with cyclophosphamide and prednisone (EPOCH) in patients with relapsed non–Hodgkin's lymphoma [J]. *Clin Lymphoma*, 2001, 1(4): 285–292
- 20 万一元, 惠王. EPOCH 方案治疗侵袭性非霍奇金淋巴瘤近期疗效观察 [J]. *中国肿瘤临床与康复*, 2012, 19(4): 353–355
- 21 闫秀云. 利妥昔单抗联合 CHOP 方案治疗非霍奇金淋巴瘤临床研究 [J]. *中国医刊*, 2012, 47(3): 64
- (收稿日期: 2013–10–13)
- (修回日期: 2013–10–23)

柱前衍生化 RP–HPLC 测定铁皮石斛鲜品中的氨基酸的含量

鲁芹飞 毕何锋 林 培 李 妹 邓路平 黄 松

摘 要 目的 测定铁皮石斛鲜品中氨基酸的含量。方法 样品以异硫氰酸苯酯(PITC)为衍生化试剂衍生后进行 HPLC 分析。采用 CAPCELL PAK C18 SG300(250mm×4.6mm, 5 μ m) 色谱柱, 柱温为 25℃; 流动相 A 为 0.05mol/L 醋酸钠缓冲液(以醋酸调 pH 值至 6.5)–乙腈(1:1), 流动相 B 为 0.05mol/L 醋酸钠缓冲液(以醋酸调 pH 值至 6.5), 梯度洗脱, 流速为 0.6ml/min; 检测波长为 254nm。结果 15 种氨基酸浓度在 0.077~2.042 μ g 范围内呈良好的线性关系(r : 0.9994~0.9999), 平均回收率为 94.3%~107.7%。结论 本方法灵敏、准确, 具有良好的重复性和稳定性, 可用于铁皮石斛中氨基酸的检测。

关键词 铁皮石斛 衍生化 氨基酸 异硫氰酸苯酯 高效液相色谱

[中图分类号] R917 [文献标识码] A

Determination of Amino Acids in Dendrobium Officinale Fresh Product with Pre–column derivatization RP–HPLC. Lu Qinfei, Bi Hefeng, Lin Pei, Li Mei, Deng Luping, Huang Song. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangdong 510006, China

Abstract Objective To determine and analyze amino acids in Dendrobium officinale Fresh Product. **Methods** The sample was derivatized with phenyl isothiocyanate(PITC). HPLC was performed on a CAPCELL PAK C18 SG300(4.6mm×250mm, 5 μ m) column with gradient elution of 0.05mol/L sodium acetate buffer solution (adjusted to pH 6.5 with acetic acid)–acetonitrile (1:1) (A) and 0.05mol/L sodium acetate buffer solution (adjusted to pH 6.5 with acetic acid) (B) at the flow rate of 0.6ml/min, detected at 254nm. Column temperature was 25℃. **Results** Fifteen aminoacids had good linearity in the ranges of 0.077–2.042 μ g (r : 0.9994–0.9999).

基金项目: 广东省科技计划项目(2008A030101009, 2011A030100011); 广东省教育部产学研结合项目(2010B090400474)

作者单位: 510006 广州中医药大学(鲁芹飞、毕何锋、林培、李妹、邓路平、黄松); 523808 东莞, 广州中医药大学中医药数理工程研究院(黄松)

通讯作者: 黄松, 博士, 副教授, 硕士生导师, 电子信箱: huangnn421@163.com

The average recoveries were 94.3% – 107.7%. **Conclusion** The method is sensitive and accurate with good stability, which is useful for the determination of amino acids in *Dendrobium officinale*.

Key words *Dendrobium officinale*; Derivatization; Amino acids; Phenyl isothiocyanate (PITC); HPLC

铁皮石斛 (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo), 兰科石斛属植物, 有滋阴益胃、清热生津、益智安神、强精壮骨之功效, 一直以来, 被视为名贵药材^[1]。目前对铁皮石斛的研究多集中在多糖方面, 氨基酸方面的研究相对较少, 有关铁皮石斛氨基酸类成分的含量分析均是使用氨基酸分析仪, 因为其局限性, 限制了氨基酸的研究^[2-6]。近年来柱前衍生反相高效液相色谱法分析氨基酸技术有了广泛应用, 相应的促进了氨基酸的进一步研究^[7-12]。目前常用的柱前衍生剂有: 邻苯二甲醛 (OPA)、氯甲酸苄基酯 (FMOC-Cl)、异硫氰酸苯酯 (PITC)、丹酰氯 (Dansyl-Cl) 等。近些年, 铁皮石斛除了常规的作为药物应用, 铁皮石斛的鲜品越来越多的被作为保健食品应用。本实验采用 PITC 作为柱前衍生剂结合反相高效液相色谱技术测定了铁皮石斛鲜品药材中游离氨基酸的含量, 以为铁皮石斛中氨基酸的深入研究做好基础, 同时为铁皮石斛鲜品的综合应用提供科学依据。

材料与方法

1. 材料: (1) 药品与试剂: 15 种氨基酸对照品 (中国药品生物制品检定所购买, 编号为: 624-200104); PITC 衍生剂 (色谱纯, 美国 Sigma 公司); 乙腈 (色谱纯, 德国 Merck 公司); 其他试剂均为分析纯; 5 批铁皮石斛鲜品药材由广东永生源生物科技有限公司提供, 经广州中医药大学陈建南研究员鉴定为兰科石斛属植物铁皮石斛 (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo), 标本存放于广州中医药大学新药开发研究中心。(2) 实验仪器: SHIMADZU 高效液相色谱仪 (日本岛津公司), SPD-20A 紫外可见光检测器, Sartorius BP110S 电子天平 (德国); Sartorius CP225D 电子天平 (德国); Aquapro 艾科浦 u 系列纯水机; KQ3200DE 型医用数控超声波清洗器 (江苏昆山市超声仪器有限公司); EYELA M-旋转蒸发仪 (日本), SHZ-D (III) 循环水式真空泵。

2. 方法: (1) 色谱条件: CAPCELL PAK C18 SG300 色谱柱 (250mm × 4.6mm, 5μm), 流动相 A 为乙腈: 0.05mol/L 醋酸钠 = 1:1, 流动相 B 为 0.05mol/L 醋酸钠 (pH 值 6.5), 检测波长 254nm, 流速为 0.6ml/min, 室温。流动相梯度条件见表 1。(2) 对照品溶液的制备: 精密称取 15 种氨基酸对照品 [天冬氨酸 (Asp)、丙氨酸 (Ala)、谷氨酸 (Glu)、丝氨酸 (Ser)、甘氨酸 (Gly)、苯丙氨酸 (Phe)、组氨酸 (His)、蛋氨酸 (Met)、精氨酸 (Arg)、酪氨酸 (Tyr)、缬氨酸 (Val)、脯氨酸 (Pro)、异亮氨酸 (Ile)、亮氨酸 (Leu)、赖氨酸 (Lys)] 各 20mg, 分别置于 10ml 容量瓶中, 加 0.1mol/L 盐酸使其溶解, 并定容至刻度, 即得 15

种氨基酸单一对照品溶液。分别精密移取谷氨酸、天冬氨酸、丝氨酸、甘氨酸、组氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸、精氨酸对照品溶液各 2.0ml, 置 25ml 容量瓶中, 加 0.1mol/L 盐酸稀释至刻度, 即得氨基酸混合标准品-1。分别精密移取酪氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、胱氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸、赖氨酸对照品溶液各 2.0ml, 置 25ml 容量瓶中, 加 0.1mol/L 盐酸稀释至刻度, 即得氨基酸混合标准品-2。分别精密移取氨基酸混合标准品-1、氨基酸混合标准品-2 各 1.0ml, 置 10ml 离心管中, 精密加入 1.0mol/L 三乙胺乙腈溶液、0.1mol/L PITC 乙腈溶液各 2.0ml, 涡旋混匀 1min, 室温下放置 60min, 加正己烷 4ml, 涡旋混匀 1min, 室温下放置 10min, 弃去上层正己烷层, 反复萃取 3 次, 移取下层溶液置 5ml 容量瓶中, 用 0.05mol/L 醋酸钠溶 (pH 值 6.5) 定容至刻度, 微孔滤膜 (0.22μm) 过滤, 进样 10μl。(3) 供试品溶液 (1 号样品) 的制备: 取铁皮石斛鲜品样品 2.0g, 剪成不超过 3mm 的小段, 研碎, 混合均匀, 分别加 70% 乙醇 40ml 超声提取 2 次, 每次 40min, 合并滤液, 减压回收溶剂至干, 0.1mol/L 盐酸溶解, 转移到 5ml 容量瓶中, 加 0.1mol/L 盐酸稀释至刻度。取 2.0ml 供试品溶液置 10ml 离心管中, 按“对照品溶液的制备”项下方法自“精密加入 1.0mol/L 三乙胺乙腈溶液”起操作, 即得。(4) 空白溶液的制备: 取 0.1mol/L 盐酸溶液 5ml, 按“对照品溶液的制备”项下方法自“置 10ml 离心管中, 精密加入 1.0mol/L 三乙胺乙腈溶液”起操作, 即得。(5) 专属性考察: 取衍生后的混合对照品溶液、供试品溶液及空白溶液各 10μl, 按“色谱条件”项下色谱条件进样。(6) 线性关系的考察: 精密吸取衍生后的对照品溶液 1、5、10、15、20、25μl, 注入高效液相色谱仪中, 按“对照品溶液的制备”项下的色谱条件测定, 记录色谱峰面积。(7) 精密度试验: 取“对照品溶液的制备”项中衍生后的混合标准品溶液, 按上述色谱条件连续进样 6 次, 记录 15 种氨基酸的峰面积, 15 种氨基酸的 RSD 皆小于 3.0%。(8) 稳定性试验: 取“供试品溶液 (1 号样品) 的制备”项下的供试品溶液, 按上述色谱条件分别于 0、4、6、8、12、24h 进样, 测定峰面积, 15 种氨基酸的 RSD 皆小于 3.0%。(9) 重复性试验: 精密称取同一批样品 6 份, 每份约 2.0g。按“供试品溶液的制备”项下方法制备供试品溶液, 依上述色谱条件进样测定, 计算各氨基酸含量, 15 种氨基酸的 RSD 皆小于 3.0%。(10) 加样回收试验: 精密称取已知含量的样品 6 份各 1.0g, 剪成不超过 3mm 的小段, 研碎, 混合均匀, 再分别加入氨基酸混合标准品-1 和混合标准品-2 各 500μl, 按“供试品溶液 (1 号样品) 的制备”项下的方法自“分别加 70% 乙醇 40ml 超声提取 2 次, 每次 40min”起操作, 制备所需溶液, 按上述色谱条件进样测定, 计算回收率。15 种氨基酸的平均回收率为 94.3% ~ 104.7%, 除 Asp、Met、Phe 的 RSD 大于 3.0% 外, 其余 12 种氨基酸的

RSD 皆小于 3.0%。(11)样品测定:取按“供试品溶液的制备”项下的方法制备的样品溶液 15μl,按照上述的色谱条件进行测定。

表 1 流动相梯度条件

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	5	95
15	5	95
60	23	77
100	50	50
115	60	40
125	5	95

结 果

1. 专属性考察结果:15 种氨基酸色谱峰分离度良好,空白无干扰,见图 1。

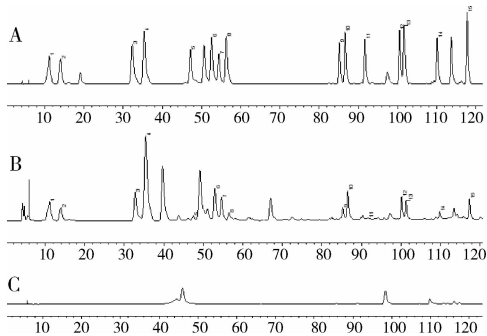


图 1 对照品(A)、样品(B)和空白(C)HPLC 色谱图

1. Asp;2. Glu;3. Ser;4. Gly 5. His;6. Ala;7. Arg;8. Pro;9. Tyr;
10. Val;11. Met;12. Ile;13. Leu;14. Phe;15. Lys

2. 线性关系考察结果:以进样量为横坐标(X)、峰面积为纵坐标(Y),进行线性回归,得 15 种氨基酸的回归方程,详见表 2。

表 2 15 种氨基酸的回归方程、相关系数及线性范围

成分	回归方程	线性范围 (μg)	r
Asp	$Y = 3E + 06X + 5255.6$	0.08108 ~ 2.027	0.9999
Glu	$Y = 4E + 06X + 10505$	0.07792 ~ 1.948	0.9998
Ser	$Y = 6E + 06X + 53208$	0.07836 ~ 1.959	0.9996
Gly	$Y = 8E + 06X - 45947$	0.07868 ~ 1.967	0.9999
His	$Y = 4E + 06X - 62118$	0.08056 ~ 2.014	0.9999
Ala	$Y = 6E + 06X + 60226$	0.07844 ~ 1.961	0.9998
Arg	$Y = 4E + 06X - 20358$	0.08004 ~ 2.001	0.9999
Pro	$Y = 6E + 06X - 902.43$	0.07956 ~ 1.989	0.9999
Tyr	$Y = 4E + 06X + 28241$	0.08168 ~ 2.042	0.9999
Val	$Y = 5E + 06X + 90276$	0.08056 ~ 2.014	0.9998
Met	$Y = 4E + 06X + 21705$	0.08012 ~ 2.003	0.9998
Ile	$Y = 4E + 06X + 126335$	0.07732 ~ 1.933	0.9994
Leu	$Y = 7E + 06X + 288443$	0.08144 ~ 2.036	0.9996
Phe	$Y = 4E + 06X + 193627$	0.07892 ~ 1.973	0.9995
Lys	$Y = 6E + 06X + 81062$	0.07932 ~ 1.983	0.9999

3. 样品测定结果:样品测定结果见表 3,铁皮石斛 5 种鲜品中的游离氨基酸主要以天门冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、丝氨酸(Ser)、甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)为主,占游离氨基酸总量的 50% 以上。5 种鲜品中蛋氨酸(Met)和苯丙氨酸(Phe)含量均较低。

表 3 5 批鲜品石斛中 15 种氨基酸含量 (mg/g)

氨基酸	1	2	3	4	5
Asp	0.165	0.125	0.261	0.147	0.241
Glu	0.092	0.093	0.141	0.099	0.117
Ser	0.065	0.043	0.077	0.050	0.059
Gly	0.075	0.071	0.094	0.058	0.123
His	0.014	0.015	0.007	0.014	0.009
Ala	0.046	0.045	0.058	0.042	0.043
Arg	0.072	0.028	0.024	0.015	0.019
Pro	0.017	0.019	0.021	0.015	0.011
Tyr	0.017	0.020	0.011	0.017	0.010
Val	0.029	0.020	0.033	0.018	0.018
Met	0.004	0.005	0.005	0.006	0.008
Ile	0.023	0.014	0.026	0.015	0.028
Leu	0.014	0.011	0.015	0.015	0.010
Phe	0.001	0.003	0.001	0.001	0.001
Lys	0.022	0.013	0.013	0.010	0.010
总氨基酸	0.656	0.525	0.786	0.523	0.707

讨 论

在对氨基酸进行衍生时,对衍生反应的时间,衍生剂的用量分别进行了考察,发现衍生剂的用量和衍生时间与其他文献^[6~9]报道基本一致。故采用较多文献报道的衍生剂的用量和衍生反应的时间。实验测定结果与铁皮石斛干品的氨基酸含量测定结果有一些不同,可能是鲜品在加热干燥过程中,铁皮石斛的氨基酸的转化不同或是部分氨基酸的结构不稳定,遭到破坏,其具体原因有待做进一步的研究探讨。

实验过程中考察了蒸馏水、50% 乙醇、70% 乙醇 3 种不同的提取溶剂,发现 50% 乙醇和 70% 乙醇的提取效果较好,而 70% 乙醇的提取液中几乎不含有多糖,样品的衍生等处理更加便捷,故最终选择了 70% 的乙醇作为提取溶剂,实验还考查了回流和超声两种提取方式,超声提取效果更好,更加简捷,最后确定了超声提取的方法。

参考文献

1 李玲,邓晓兰,赵兴兵,等. 铁皮石斛化学成分及药理作用研究进展[J]. 肿瘤药学,2011,2:90-94
2 蒋秀美,刘骅,张治国. 铁皮石斛和金钗石斛的氨基酸分析[J]. 浙江省医学科学院学报,1999,39:26
3 李妮亚,高培元,王紫. 海南石斛属和金石斛属植物多糖及氨基

- 酸含量分析[J]. 植物资源与环境学报, 2004, 4: 57-58
- 4 何铁光, 苏江, 王灿琴, 等. 铁皮石斛不同来源材料多糖和氨基酸含量的比较[J]. 广西农业科学, 2007, 1: 32-34
- 5 黄民权, 阮金月. 铁皮石斛氨基酸组分分析[J]. 中药材, 1997, 1: 32-33
- 6 吴庆生, 丁亚平, 杨道麒, 等. 安徽霍山三种石斛中游离氨基酸分析[J]. 安徽农业科学, 1995, 3: 268-269, 271
- 7 翟旭峰, 郭晓蕾, 朱龙平, 等. 柱前衍生化 RP-HPLC 测定不同产地灵芝中 6 种氨基酸的含量[J]. 中药材, 2011, 12: 1846-1848
- 8 孙莲, 张焯, 王岩, 等. 柱前衍生化 RP-HPLC 测定芫菁子中的 12 种游离氨基酸[J]. 华西药杂志, 2008, 4: 490-491
- 9 刘丽敏, 王海敏, 等. 柱前衍生反相高效液相色谱法测定西洋参中游离氨基酸[J]. 中成药, 2009, 2: 275-278
- 10 孙莲, 张焯, 孟磊, 等. 柱前衍生 RP-HPLC 法测定桑叶中 16 种游离氨基酸的含量[J]. 中国药房, 2008, 36: 2830-2832
- 11 罗晓健, 吴志鹏, 黄璐琦, 等. 氨基酸的柱前衍生高效液相色谱分析在中草药研究中的应用[J]. 中草药, 2005, 36(4): 630-632
- 12 邹秦文, 肖新月, 程显隆, 等. 百令胶囊中 17 种氨基酸的柱前衍生化 RP-HPLC 法含量测定[J]. 药物分析杂志, 2010, 9: 1630-1635
- (收稿日期: 2013-09-09)
- (修回日期: 2013-10-11)

二维超声联合造影评分对甲状腺实性结节良恶性的诊断价值

韩 英 杨 娟 吕洋辉 赵臣银 刘佳兴 郑笑娟

摘 要 **目的** 探讨二维超声联合超声造影评分对甲状腺实性结节良恶性的诊断意义。**方法** 回顾性分析笔者医院 90 例由二维超声及超声造影诊断并经病理证实的共 149 个甲状腺实性结节, 以病理结果为金标准构建 ROC 曲线, 评价二维超声联合超声造影评分对甲状腺实性结节良恶性诊断的价值, 并预测结节良恶性的最佳评分临界值。**结果** 良性结节 65 个, 恶性结节 84 个, 其 ROC 曲线下面积为 0.936, 以超声得分为 6 分鉴别结节的良恶性, 诊断效能最高, 敏感度、特异性分别为 89.3%、86.2%。**结论** 二维超声联合超声造影评分对甲状腺实性结节良恶性的诊断有较大价值。

关键词 甲状腺结节 超声显像 超声评分

[中图分类号] R445 [文献标识码] A

Diagnostic Value of Scoring Method of Two-dimensional Ultrasound and Contrast-enhanced Ultrasound in Benign and Malignant Solid Thyroid Nodules. Han Ying, Yang Juan, Lv Yanghui, Zhao Chenyin, Liu Jiaying, Zheng Xiaojuan. Department of Ultrasound Center, Zhoushan Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 316000, China

Abstract Objective To explore the diagnostic significance of scoring method of two-dimensional ultrasound and contrast-enhanced ultrasound in the differentiation between benign and malignant solid thyroid nodules. **Methods** A total of 149 thyroid solid nodules in 90 patients diagnosed by two-dimensional ultrasound and contrast-enhanced ultrasound were confirmed by pathology. Receiver operating characteristic (ROC) curve was drew with the pathological results as standard, to evaluate the diagnostic value of scoring method of two-dimensional ultrasound and contrast-enhanced ultrasound in benign and malignant solid thyroid nodules, and the best score threshold can be predicted. **Results** The pathology results demonstrated that 84 nodules were malignant and 65 nodules were benign. The area under the ROC curve was 0.936 and 6 points had the best diagnostic efficiency. The best score threshold for differentiating benign from malignant thyroid nodules was 6 with a sensitivity of 89.3% and a specificity of 86.2%. **Conclusion** The scoring method of two-dimensional ultrasound and contrast-enhanced ultrasound plays an important role in the diagnosis of benign and malignant solid thyroid nodules.

Key words Thyroid nodule; Ultrasound imaging; Ultrasound scoring

基金项目: 浙江省科技厅公益性技术应用研究计划基金资助项目(2012C23059); 舟山市卫生局基金资助项目(2009A02); 2009 年舟山市科技局基金资助项目(043)

作者单位: 316000 温州医学院附属舟山医院超声诊断中心(韩英、杨娟、刘佳兴、郑笑娟), 神经内科(吕洋辉), 甲乳外科(赵臣银)

通讯作者: 郑笑娟, 电子邮箱: zhengxiaojuan7173@126.com