

• 方药研究 •

## 抗 HIV 化学成分 DB02 在大鼠体内的初步药代动力学研究\*

齐欢<sup>1</sup>, 赵高琼<sup>2,3,4</sup>, 刘红斌<sup>2,3,4</sup>, 崔佳丽<sup>2,3,4</sup>, 张培培<sup>2,3,4</sup>,  
周艺佳<sup>2,3,4</sup>, 何严萍<sup>5△</sup>, 王京昆<sup>2,3,4△</sup>

- (1. 大理大学药学与化学学院, 云南 大理 671000; 2. 云南白药集团创新研发中心, 云南 昆明 650111;  
3. 云南省药物研究所药物安全性评价中心, 云南 昆明 650111;  
4. 云南省中药和民族药新药创制企业重点实验室, 云南 昆明 650111;  
5. 云南大学化学科学与工程学院, 教育部自然资源药物化学重点实验室, 云南 昆明 650091)

**摘要:** **目的** 建立大鼠血浆中 DB02 的高效液相色谱质谱联用(HPLC-MS/MS)检测方法, 并进行 DB02 的大鼠尾静脉注射给药药代动力学研究。**方法** 6 只 Sprague Dawley (SD) 大鼠, 雌雄各半, 尾静脉注射 DB02 增溶溶液 1.004 mg/kg·bw, 分别于不同时间点眼底静脉丛取血, HPLC-MS/MS 测定各时间点大鼠血药浓度, 应用 DAS2.0 计算药代参数。**结果** 所建立的检测方法在 4.60~930 ng/mL 浓度范围内, 线性关系良好, 定量下限为 4.60 ng/mL (S/N ≥ 10), 对 13.6, 123, 923 ng/mL 3 个浓度的 DB02 大鼠血浆质控样品进行回收率、精密度与准确度考察, 各浓度回收率均在 90% 以上, 日内与日间精密度均小于 15%, 准确度为 93.34%~102.51%, 符合《药物非临床药代动力学研究技术指导原则》要求。大鼠尾静脉注射 DB02 后药代参数如下:  $C_{max} = (513 \pm 69) \mu\text{g/L}$ ;  $t_{1/2} = (33.4 \pm 5.3) \text{min}$ ;  $AUC_{(0-\infty)} = (8.15 \pm 0.06) \text{mg/L} \cdot \text{min}$ 。**结论** 实验所建立的 HPLC-MS/MS 分析方法简单、快速、准确, 能够满足 DB02 在大鼠体内的药代动力学的研究要求。按照 1.004 mg/kg 单剂量单次静脉给药后, DB02 在大鼠体内的血药浓度-时间曲线呈一房室模型。

**关键词:** 高效液相色谱质谱联用; 血药浓度; 药代动力学参数; 非核苷类; 逆转录酶抑制剂

**中图分类号:** R285.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2016)02-0015-07

**DOI:** 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2016.02.005

艾滋病(AIDS)是一种由感染免疫缺陷病毒(HIV)引起的传染性疾病, 由于尚无有效预防 HIV 病毒的疫苗问世, 药物治疗仍是控制 AIDS 最为有效的手段, 现有治疗药物不同程度存在毒副作用大、易产生耐药及价格昂贵等问题, 因此开发具有高效低毒、耐药屏障高、价格相对适中的新型抗艾滋病药物迫在眉睫<sup>[1-4]</sup>。何严萍等报道了系列新型硫-二氢芳基/烷基硫-环己甲基嘧啶酮类(dihydro-aryl/alkylsulfanyl-cyclohexylmethyl-oxopyrimidines, S-DACOs)非核苷类逆转录酶抑制剂(NNRTIs), 可以在较低纳摩尔范围内抑制 HIV-1 的复制。其中, 优选化合物 6-环己甲基-5-乙基-2-(2-氧代-2-苯乙基硫)嘧啶-4(3H)-酮(DB02)对于细胞系细胞和原代 PBMC 细胞毒

性很小, 对不同的实验株、不同亚型嗜性的临床株都有很好的抑制活性, 与临床上使用的抗 HIV 药物奈韦拉平相比, DB02 具有高效、安全、耐药屏障高等特点<sup>[5-13]</sup>。为进一步评价 DB02 的成药性、为临床研究提供参考, 本研究建立了大鼠血浆中 DB02 的高效液相色谱质谱联用(HPLC-MS/MS)检测方法, 对 DB02 的大鼠尾静脉注射给药药代动力学进行研究。

### 1 材料与方法

#### 1.1 供试品及内标化合物

供试品为 DB02, 由云南大学化学科学与工程学院提供, 纯度大于 98%。内标化合物为草乌甲素(批号: 100530-200501), 由中国药品生物制品检定所, 纯度大于 98%。

\* 基金项目: 国家自然科学基金(30960459); 云南省科技计划项目(2009BC019)

收稿日期: 2016-03-01

作者简介: 齐欢(1991-), 女, 黑龙江大庆人, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药化学及有效成分活性和作用机制。

△通信作者: 王京昆, E-mail: wjkyimm@163.com; 何严萍, E-mail: yphe@ynu.edu.cn

## 1.2 实验试剂

醋酸铵(色谱纯, SIGMA), 甲醇(色谱纯, 默克), 乙酸乙酯、羧甲基纤维素钠、石油醚 60~90℃(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司), 氨水(分析纯, 重庆川东化工(集团)有限公司化学试剂厂), DMSO(色谱纯, 江苏汉邦科技有限公司)。

## 1.3 实验动物

SD大鼠6只, 体质量220~260g, 雌雄各半, 由北京维通利华试验动物有限公司提供, 合格证号: SCXK(京)2012-0001。

## 1.4 实验仪器

Agilent 1200SL 高效液相色谱仪, API3200Q-Trap 三重四级杆质谱仪系统, Allegra 64R 型高速冷冻台式离心机(BECKMAN), MD200 型氮气吹扫仪(杭州奥盛仪器有限公司), SK8200LHC 型超声仪(上海科导超声仪器有限公司), 移液器(德国ependorf公司)。

## 1.5 溶液配制及保存

### 1.5.1 DB02 储备液配制

精密称取 DB02 供试品 8.35、8.30mg 2 份, 分别置于 25mL 棕色容量瓶中, DMSO 超声 30min 溶解并定容, 即得浓度分别为 334、332 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的储备液, 常温避光保存。

### 1.5.2 标准曲线工作液配制

精密移取 334 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 DB02 储备液于 EP 管中, DMSO 逐级稀释, 分别得到浓度为 4.65 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 1.86 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 620ng/mL, 207ng/mL, 69.0ng/mL, 23.0ng/mL 的标准曲线工作液, 常温避光保存, 现配现用。

### 1.5.3 质控工作液配制

精密移取 332 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 DB02 储备液于 EP 管中, DMSO 逐级稀释, 分别得到浓度为 4.60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、613ng/mL、68.0ng/mL 的质控工作液, 常温避光保存, 现配现用。

### 1.5.4 草乌甲素(BLA)内标工作液配制

精密称取草乌甲素对照品 5.12mg, 置于 25mL 容量瓶中, 甲醇溶解并定容至刻度, 即得浓度为 205 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的草乌甲素内标储备液。精密移取 100 $\mu\text{L}$  草乌甲素内标储备液置于 50mL 容量瓶中, 甲醇稀释并定容至刻度, 即得浓度为 410ng/mL 的草乌甲素内标工作液, 2~8℃密封保存。

### 1.5.5 尾静脉注射给药溶液(DB02 增溶溶液)

DB02 增溶溶液(含量为 5mg/g, 由本所制剂室

提供), 辅料为聚氧乙烯蓖麻油、二乙二醇单乙醚、PVPK30、油酸等。

## 1.6 检测方法<sup>[14-16]</sup>

### 1.6.1 色谱条件

色谱柱: 资生堂 CAPCELLPAK C18 (3.0mm $\times$ 5cm, 3 $\mu\text{m}$ ); 流动相: A(2mmol/L 醋酸铵溶液, 氨水调 pH=9)-B(甲醇), 梯度洗脱: 0~0.2min: 40%~85% B; 0.2~4min: 85%~85% B; 4~4.2min: 85%~40% B; 4.2~5.5min: 40%~40% B。流速: 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ , 柱温: 30℃, 进样量: 5 $\mu\text{L}$ 。

### 1.6.2 质谱条件

ESI 源, 正离子模式, MRM(质谱多反应监测)方式定量。CUR: 30.0; CAD: Medium; IS: 5500.0V; TEM: 600.0℃; GS1: 60.0; GS2: 60.0; Interface Heater(ihe): on。DB02 母离子:  $m/z=371.3$ , 子离子:  $m/z=105.0$ ; DP(去簇电压): 68; EP(入口电压): 10; CE(碰撞能量): 40; CXP(出口电压): 3。草乌甲素(BLA)母离子:  $m/z=644.4$ , 子离子:  $m/z=584.3$ ; DP(去簇电压): 72; EP(入口电压): 10; CE(碰撞能量): 45; CXP(出口电压): 7; 碰撞气体为氮气。

## 1.7 血浆样品处理方法

### 1.7.1 空白血浆样品处理

取大鼠空白血浆 50 $\mu\text{L}$ , 加入 1mL 混合提取溶剂(石油醚: 乙酸乙酯=1:5, v/v), 涡旋 2min, 6 000r/min 离心 10min, 取上清 600 $\mu\text{L}$ , 氮气吹干, 残渣加入 200 $\mu\text{L}$  复溶溶液(90%甲醇, 10%流动相 A)复溶, 涡旋复溶 3min, 15 000r/min 离心, 10min 后取上清液, 待测。

### 1.7.2 标准曲线样品处理

取大鼠空白血浆 50 $\mu\text{L}$ , 加入草乌甲素内标工作液 10 $\mu\text{L}$ , 再分别加入 7 个不同浓度的标准曲线工作液 10 $\mu\text{L}$ , 涡匀, 再加入 1mL 混合提取溶剂(石油醚: 乙酸乙酯=1:5, v/v), 以下操作同“1.7.1 空白血浆样品处理”项下相同。随行空白, 同法每个浓度制备 2 份标准曲线样品。

### 1.7.3 质控样品处理

取大鼠空白血浆 50 $\mu\text{L}$ , 加入草乌甲素内标工作液 10 $\mu\text{L}$ , 再分别加入 3 个不同浓度的质控工作液 10 $\mu\text{L}$ , 涡匀, 再加入 1mL 混合提取溶剂(石油醚: 乙酸乙酯=1:5, v/v), 以下操作同“1.7.1 空白血浆样品处理”项下相同, 每个浓度制备 6 份样品。

### 1.7.4 含药血浆样品处理

取大鼠含药血浆样品 50 $\mu$ L, 加入草乌甲素内标工作液 10 $\mu$ L, 涡匀, 再加入 1mL 混合提取溶剂(石油醚:乙酸乙酯=1:5, v/v), 以下操作同“1.7.1 空白血浆样品处理”项下相同。

### 1.8 DB02 增溶液大鼠尾静脉注射给药药代动力学研究

取 SD 大鼠 6 只, 雌雄各半, 实验前禁食 12h, 自由饮水, 按 1.004mg/kg·bw 尾静脉注射 DB02 增溶液, 分别于 3, 6, 10, 20, 40, 60, 120, 180min 眼底静脉丛取血约 0.2mL, 3 000r/min 离心 15min 后分离获得含药血浆, 按“1.7.4 含药血浆样品处理”项下处理并测定浓度。

## 2 结果

### 2.1 特异性

对 DB02 供试品进行质谱扫描, 得到 Q1 全扫描质谱图(图 1)及碎片离子扫描质谱图(图 2); 对 BLA 对照品进行质谱扫描, 得到 Q1 全扫描质谱图(图 3)及碎片离子扫描质谱图(图 4)。按照“1.7.1 空白血浆样品处理”项下处理得到大鼠空白血浆样品; 按照“1.7.2 标准曲线样品处理”项下处理得到大鼠空白血浆加标准品样品; 按照“1.7.4 含药血浆样品处理”项下处理得到大鼠给药后血浆样品。上述样品按照“1.6 DB02 HPLC-MS/MS 检测方法”进行测定, 分别得到大鼠空白血浆样品图谱(图 5A)、大鼠空白血浆加标准品样品图谱(图 5B)、大鼠给药后血浆样品(图 5C)。如图可知, DB02 在大鼠空白血浆、大鼠空白血浆加标准品、大鼠含药血浆中保留时间一致, 血浆中内源性物质对 DB02、BLA 均无干扰, DB02 的出峰时间为 3.68min, BLA 的出峰时间为 3.18min。

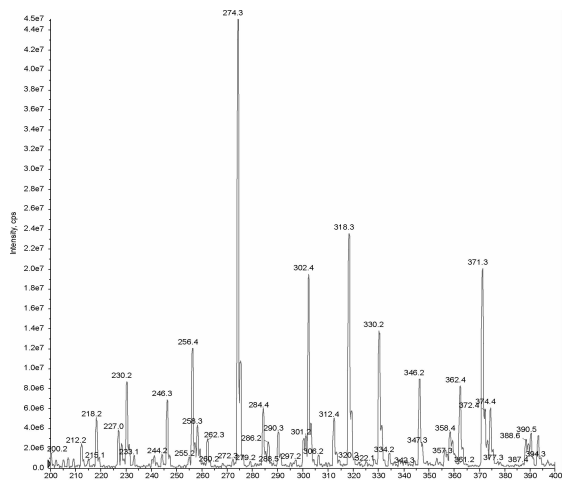


图 1 DB02 Q1 全扫描质谱图

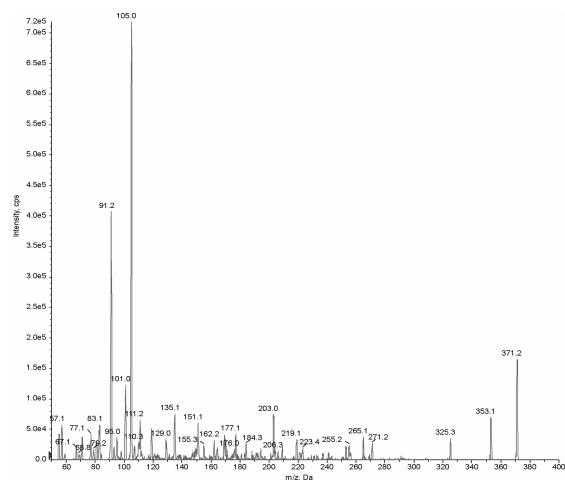


图 2 DB02 碎片离子扫描质谱图

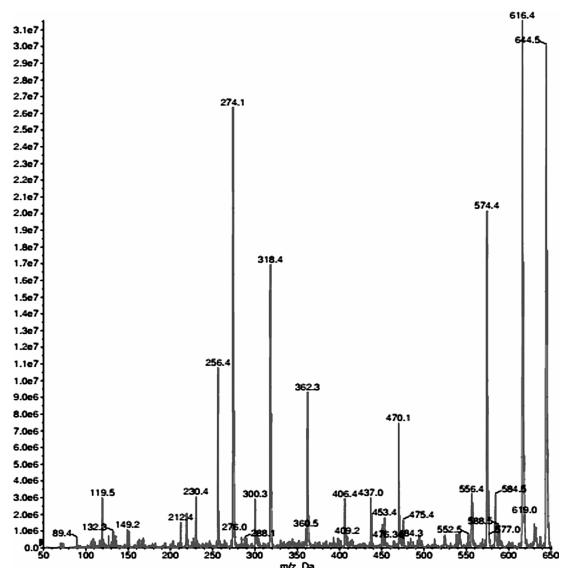


图 3 BLA Q1 全扫描质谱图

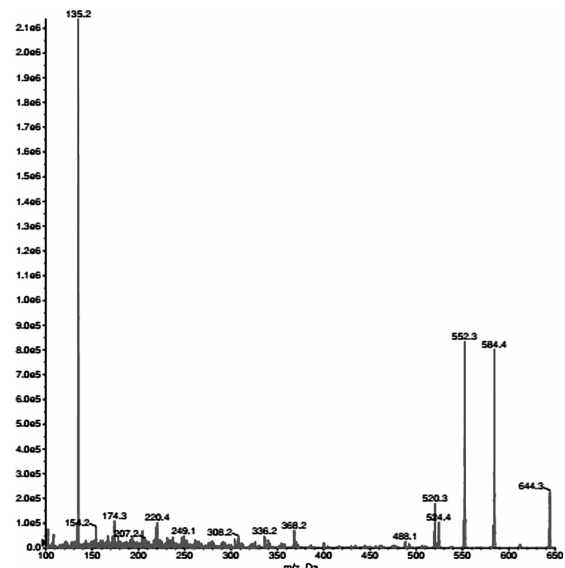
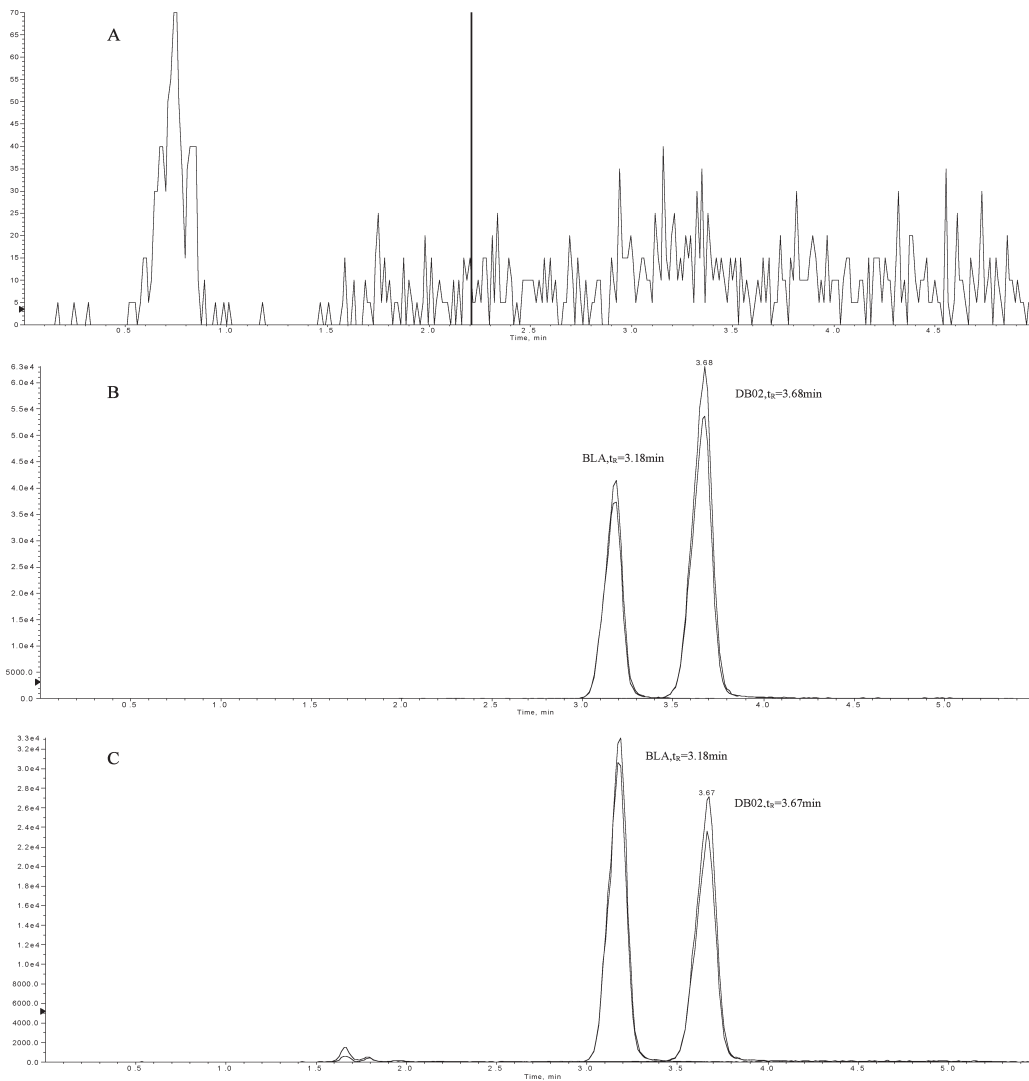


图 4 BLA 碎片离子扫描质谱图



A. a blank rat plasma; B. a blank rat plasma spiked with DB02 and BLA;  
C. a rat plasma sample obtained 40 min after i.v.administration with a dose of 1.004mg/kg of DB02.

图5 大鼠血浆色谱图

### 2.2 标准曲线与定量下限

按照“1.7.2 标准曲线样品处理”项下处理血样后进样测定。以DB02峰面积和内标峰面积的比值为纵坐标Y, DB02标准工作液浓度和内标工作液浓度的比值为横坐标X, 采用加权最小二乘法拟合, 求得回归方程:  $y=0.0035x+0.00314$ ,  $r=0.9977$ , 线性范围: 4.60~930ng/mL, 定量下限: 4.60ng/mL。

### 2.3 精密度与准确度

按照“1.7.3 质控样品处理”项下操作, 分别制备低、中、高3个浓度的质控样品, 每一浓度平行操作6份, 重复3个批次, 随行标准曲线, 以当日的标准曲线计算质控样品的浓度, 测定结果见表1。DB02低、中、高3个浓度质控溶液的日内精密

度的RSD值分别为2.88%, 5.26%, 5.68%, 日间精密密度分别为3.75%, 3.44%, 2.18%, 其日内与日间精密密度RSD均小于15%, 表明该含量测定方法的精密密度符合要求。

表1 DB02在大鼠血浆中的精密密度与准确度

| 浓度<br>(ng/mL) | 日内(n=6)                    |             |            | 日间(n=6)                    |             |            |
|---------------|----------------------------|-------------|------------|----------------------------|-------------|------------|
|               | $\bar{x} \pm s$<br>(ng/mL) | 精密密度<br>(%) | 准确度<br>(%) | $\bar{x} \pm s$<br>(ng/mL) | 精密密度<br>(%) | 准确度<br>(%) |
| 13.6          | 13.9±0.4                   | 2.88        | 102.51     | 13.3±0.5                   | 3.75        | 97.38      |
| 123           | 114±6                      | 5.26        | 93.34      | 116±4                      | 3.44        | 94.81      |
| 923           | 914±52                     | 5.68        | 97.25      | 919±20                     | 2.18        | 98.52      |

### 2.4 基质效应

取大鼠空白血浆50μL, 加入1mL混合提取溶



剂(石油醚:乙酸乙酯=1:5, v/v), 涡旋 2min, 6 000r/min 离心 10min, 取上清 600 $\mu$ L, 氮气吹干, 得到残渣 a。同法处理得到 18 份残渣 a。

取草乌甲素内标工作液 30 $\mu$ L, 再分别对应加入 3 个不同浓度的质控工作液 30 $\mu$ L, 每个浓度 6 份, 然后加入 940 $\mu$ L 复溶溶液(90%甲醇, 10%流动相 A), 涡匀, 即得低、中、高 3 个浓度各 6 个样本的溶液 b 系列。

用 3 个不同浓度的溶液 b 系列溶解 18 份残渣 a, 分别得到 3 个不同浓度的含基质的溶液 c 系列, 按照“1.6 DB02 HPLC-MS/MS 检测方法”进行测定, 测得溶液 c 系列的峰面积  $A_1$ 。同法测定得无基质的溶液 b 系列的峰面积  $A_2$ 。

以同一浓度含基质的溶液 c 系列峰面积  $A_1$  与无基质的溶液 b 系列峰面积  $A_2$  的比值( $A_1/A_2$ )计算基质效应。结果如表 2 所示。

表 2 DB02 在大鼠血浆中的基质效应( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

| 浓度/(ng/mL) | $A_1$             | $A_2$              | 基质效应(%)          |
|------------|-------------------|--------------------|------------------|
| 13.6       | 7945 $\pm$ 471    | 10236 $\pm$ 512    | 77.79 $\pm$ 6.15 |
| 123        | 67013 $\pm$ 1148  | 93967 $\pm$ 916    | 71.32 $\pm$ 1.39 |
| 923        | 455652 $\pm$ 4942 | 652667 $\pm$ 12227 | 69.83 $\pm$ 1.42 |

## 2.5 提取回收率

按照“1.7.3 质控样品处理”项下处理得到质控样品, 测定得到峰面积  $A_3$ ; 按照“2.4 基质效应”项下操作, 测定得到溶液 c 系列峰面积  $A_1$ ; 两者对应浓度峰面积的比值( $A_3/A_1$ ), 即为提取回收率。结果如表 3 所示。

表 3 DB02 在大鼠血浆中提取回收率( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

| 浓度/(ng/mL) | $A_1$ /(cps)      | $A_3$ /(cps)       | 回收率/(%)           |
|------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| 13.6       | 7945 $\pm$ 471    | 8025 $\pm$ 882     | 100.89 $\pm$ 7.18 |
| 123        | 67013 $\pm$ 1148  | 61660 $\pm$ 3324   | 91.98 $\pm$ 3.90  |
| 923        | 455652 $\pm$ 4942 | 415167 $\pm$ 17512 | 91.14 $\pm$ 4.42  |

## 2.6 稳定性

取 50 $\mu$ L 空白大鼠血浆, 分别加入低、中、高不同浓度的 DB02 质控工作液 10 $\mu$ L, 分别室温放置 6h、冻融 3 次和 -20 $^{\circ}$ C 冻存 3d, 按照“1.7.3 质控样品处理”项下操作, 进行进样分析, 考察血浆样品在不同条件下的稳定性, 每个浓度平行处理 6 份样品, 记录峰面积。

按照“1.7.3 质控样品处理”项下操作, 得到不同浓度的质控样品, 分别室温放置 2d、2~8 $^{\circ}$ C 放置 1d

后, 进样分析, 考察处理后的血浆样品在不同条件下的稳定性, 每个浓度平行处理 6 份样品, 记录峰面积。

上述结果如表 4 所示。

表 4 DB02 在大鼠血浆中的稳定性

| 浓度/(ng/mL) | RE(%)   |        |                        |         |                        |
|------------|---------|--------|------------------------|---------|------------------------|
|            | 血浆样品    |        |                        | 进样溶液    |                        |
|            | 室温放置 6h | 冻融 3 次 | -20 $^{\circ}$ C 冻存 3d | 室温放置 2d | 2~8 $^{\circ}$ C 放置 1d |
| 13.6       | 7.61    | 4.36   | 0.64                   | 5.73    | 8.70                   |
| 123        | 11.04   | 7.00   | 1.61                   | 3.73    | 7.12                   |
| 923        | 10.35   | 13.33  | 3.53                   | 0.11    | 1.69                   |

## 2.7 大鼠尾静脉注射给药药代动力学研究

### 2.7.1 时间-浓度曲线

按照 1.004mg/kg 剂量大鼠尾静脉注射给予 DB02 增溶液, 测定不同时间点血浆中 DB02 的峰面积, 并根据回归方程计算血药浓度, 药物浓度-时间曲线如图 6。

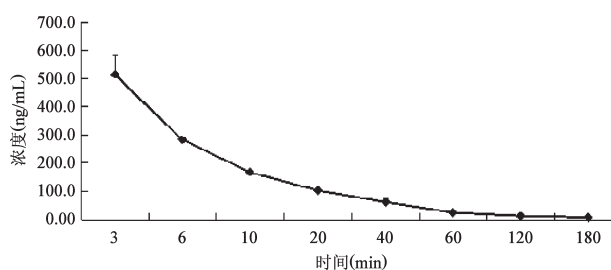


图 6 大鼠尾静脉注射(1.004 mg/kg)DB02 的药物浓度-时间曲线

### 2.7.2 药代动力学参数

采用 DAS2.0 药代动力学软件的非房室模型法分析药代动力学参数, 表 5 为 DB02 在大鼠体内的主要药代动力学参数。

表 5 DB02 在大鼠体内的主要药代动力学参数

| 参数                 | 数值                        |
|--------------------|---------------------------|
| $AUC_{(0-t)}$      | (8.15 $\pm$ 0.06)mg/L*min |
| $AUC_{(0-\infty)}$ | (8.34 $\pm$ 0.08)mg/L*min |
| $MRT_{(0-t)}$      | (32.6 $\pm$ 2.2)min       |
| $MRT_{(0-\infty)}$ | (40.1 $\pm$ 2.6)min       |
| $t_{1/2}$          | (33.4 $\pm$ 5.3)min       |
| $V_z$              | (6.00 $\pm$ 1.00)mL/kg    |
| $C_{max}$          | (513 $\pm$ 69) $\mu$ g/L  |

注:AUC 表示药时曲线下面积;MRT 表示平均驻留时间; $t_{1/2}$  表示半衰期; $V_z$  表示表观分布容积; $C_{max}$  表示最大血药浓度。

### 3 讨论

#### 3.1 溶剂的选择

通过对 DB02 溶解度进行考察,发现 DB02 在甲醇、乙醇、水等大极性溶剂中溶解度较小,室温及低温长时间放置易析出,在三氯甲烷、乙酸乙酯、二氯甲烷、乙醚等小极性溶剂中微溶,在二甲基酰胺(DMF)、DMSO 中易溶,本实验通过对不同溶剂中 DB02 的溶解稳定性及溶解度进行考察后,最终选择 DMSO 作为配制 DB02 储备液及溶解 DB02 工作液的溶剂。但是由于 DMSO 进样质谱易引发安全隐患,对进样溶液中 DB02 的溶解稳定性进行考察后发现大比例的甲醇溶液(90%甲醇,10%流动相 A)能满足其溶解稳定性的需要,故最终选择其为复溶溶液。

#### 3.2 储备液稳定性考察

通过对 DB02 低、中、高不同浓度、不同温度、是否避光等条件进行考察后发现,不同浓度的 DB02 储备液在避光条件下放置 60d 稳定,而在光照条件下储备液含量急剧降低;在低温条件(2~8℃)下放置 15d 时储备液中有结晶析出,表明 DB02 在低温放置不稳定,而在室温条件下放置 60d 稳定,故确定 DB02 储备液应室温避光保存。

#### 3.3 提取溶剂的选择

本实验考察了乙酸乙酯、正己烷、环己烷、异丙醇、二氯甲烷-乙酸乙酯、石油醚-乙酸乙酯作为提取溶剂的提取回收率,结果发现石油醚-乙酸乙酯(体积比1:5)作为提取溶剂时的提取回收率最好,且内源性杂质不干扰 DB02 和内标的测定。

#### 3.4 色谱条件的建立

流动相的选择:在预实验中,作者考察了在流动相中分别加入 2mmol/L,5mmol/L,10mmol/L 醋酸铵后对实验的影响,发现增加醋酸铵的浓度能增大 DB02 的响应,对草乌甲素无较大影响,故最终选择 10mmol/L 醋酸铵为流动相。

#### 3.5 大鼠尾静脉研究

大鼠按 1.004mg/kg 剂量经尾静脉注射 DB02 增溶溶液后,药时曲线符合一房室模型。大鼠给药 3min 后,血药浓度为 513 $\mu$ g/L,其半衰期为 33.4min,表明药物在大鼠体内代谢较快,提示如要开发此类化合物,应选择合适的剂型或方式给药,本研究为 DB02 的临床用药研究提供了一定的理论基础。

### 参考文献:

- [1] 邹雯,刘颖,王健,等. HIV 耐药的研究现状[J]. 中国中药杂志,2013,38(15):2542-2544.
- [2] 王雪雯. 抗 HIV-1 治疗研究进展 [J]. 热带医学杂志,2013,13(5):661-664.
- [3] 于荣辉,绳宇,程继英,等. 艾滋病患者服药依从性及其影响因素的研究进展[J]. 中华现代护理杂志,2012,18(19):2342-2344.
- [4] 周婷,谢蓝. HIV 非核苷类逆转录酶抑制剂研究进展[J]. 药学学报,2004,39(8):666-672.
- [5] Yu M, Fan E, Wu J, et al. Recent advances in the DABOs family as potent HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors [J]. *Curr Med Chem*, 2011, 18 (16):2376-2385.
- [6] Yan-Ping He, Jin Long, Shui-Shuan Zhang, et al. Synthesis and biological evaluation of novel dihydro-aryl/alkylsulfanyl-cyclohexylmethyl-oxypyrimidines (S-DABOs) as high active anti-HIV agents[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21 (2):694-697.
- [7] Zhang XJ, Lu LH, Wang RR, et al. DB02-02, a C-6-Cyclohexylmethyl substituted pyrimidinone HIV-1 reverse transcriptase inhibitor with nanomolar activity, displays an improved sensitivity against K103N or Y181C than S-DABOs [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11):e81489.
- [8] 何严萍,张德华,陆礼和,等. 2-[(取代苯胺基)羰基甲硫基]-DACO 类化合物的合成及抗 HIV 活性研究 [J]. 云南大学学报(自然科学版),2013,35(1):70-75.
- [9] 王月平,闫婉露,郭琼,等. S-DABO 类非核苷类 HIV-1 逆转录抑制剂 HQSAR [J]. 科学通报,2013,58 (10):916-921.
- [10] 王月平,陆礼和,刘小峰,等. 6-(1-萘甲基)取代 S-DABO 类逆转录酶抑制剂的 3D-QSAR 研究 [J]. 云南大学学报(自然科学版),2013,35(2):208-213.
- [11] 李大雄,龙晶,林海娇,等. 6-(1H-吡啶-3-甲基)-5-乙基-3H-嘧啶-4-酮类化合物的合成及抗 HIV 活性研究 [J]. 云南大学学报(自然科学版),2010,32(5):572-576.
- [12] YIN Liqin, YU Shiwen, YAO Lingfeng, et al. QSAR studies on 6-(1-Naphthylmethyl)Substituted S-DABO derivatives as novel non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors [J]. *Chinese J Struct Chem*, 2008, 27 (10):1214-1222.
- [13] Liang Zhang, Xiao-Wei Wang, Jun-Yi Liu. Synthesis and biological evaluation of novel 2-arylalkylthio-5-iodo-6-benzyl S-DASOs as potent non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors [J]. *Journal of Chinese Pharmaceutical Science*, 2012, 21:28-32.

- [14] 陆伟根,向平,陈亭亭,等. 草乌甲素小鼠血浆浓度的液相色谱-质谱-质谱分析[J]. 中成药,2008,30(10):1499-1502.
- [15] 郝伟,马晓霞,张彬若,等. HPLC 法同时测定长喙乌头中 3 种主要二萜类生物碱含量 [J]. 药物分析杂志, 2015,35(10):1829-1832.
- [16] 冯玉红. 现代仪器分析实用教程[M]. 北京:北京大学出版社,2008:170-181,184-184.
- (编辑:徐建平)

### Preliminary Pharmacokinetics of Anti HIV Chemical Composition DB02 in Rats

QI Huan<sup>1</sup>, ZHAO Gaoqiong<sup>2,3,4</sup>, LIU Hongbin<sup>2,3,4</sup>, CUI Jiali<sup>2,3,4</sup>, ZHANG Peipei<sup>2,3,4</sup>,  
ZHOU Yijia<sup>2,3,4</sup>, HE Yanping<sup>5</sup>, WANG Jingkun<sup>2,3,4</sup>

(1. College of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Dali 671000, China;

2. Yunnan Bai Yao Group Innovation and R&D Center, Kunming 650111, China;

3. Drug Safety Evaluation Center of Yunnan Institute of Materia, Kunming 650111, China;

4. Yunnan Province Company Key Laboratory for TCM and Ethnic Drug of New Drug Creation, Kunming 650111, China;

5. Key Laboratory of Medicinal Chemistry of Natural Resource, Yunnan University, Kunming 650091, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish the measurement method of DB02 in rat plasma by HPLC-MS/MS, operating the pharmacokinetic studies of DB02 in rat after tail vein injection. **Methods** Six Sprague Dawley(SD) rats divided into male and female were administrated by intravenous injection of a solution DB02 1.004mg/kg·bw, rat retinal venous plexus bloods were collected at different time points, the drug concentrations of plasma were determined by HPLC-MS/MS, calculating the main pharmacokinetic parameters by DAS2.0. **Results** The method exhibited a linear range of 4.60~930 ng/mL for DB02 in rat plasma, the lowest limit of quantification (LLOQ) was 4.60 ng/mL (S/N≥10), to study recoveries, precision and accuracy of DB02 QC for 13.6, 123, 923 ng/mL, each concentration's recoveries were above 90%, intra-day and inter-day precision were less than 15%, accuracy was 93.34%~102.51%, to meet the chemical drugs non-clinical pharmacokinetic study technical guidelines' requirements. Pharmacokinetic parameters of DB02 in rats were as follows:  $C_{max}=(513\pm69)\mu\text{g/L}$ ;  $t_{1/2}=(33.4\pm5.3)\text{min}$ ;  $AUC_{(0-t)}=(8.15\pm0.06)\text{mg/L}\cdot\text{min}$ . **Conclusions** HPLC-MS/MS was simple, rapid, accurate, and able to meet the pharmacokinetic requirements of DB02 in rats. After 1.004mg/kg single intravenous administration of one single dose, distribution of DB02 in rats showed one compartment model.

**KEY WORDS:** HPLC-MS/MS; plasma concentration; pharmacokinetic parameters; non-nucleoside; reverse transcriptase inhibitors

(原文见第 11 页)

### Effect of Tanshinone Capsule on the Axis of Fibroblast Growth Factor 23-Klotho and Vascular Calcification in Patients with Diabetic Nephropathy

SU Baolin<sup>1</sup>, CHEN Gangyi<sup>1</sup>, LI Jing<sup>2</sup>

(1. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

2. The Affiliated Hospital of South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

**ABSTRACT: Objective** To observe the correlation of fibroblast growth factor 23 (FGF23), Klotho protein and carotid artery intima media thickness (CIMT) in diabetic nephropathy (DN) patients, and discuss the effect of Tanshinone capsule on vascular calcification. **Methods** A total of 71 cases of patients with DN stage IV, were randomly divided into treatment group (36 cases), control group(35 cases). All patients were treated with basic treatment, and the treatment group was added with Tanshinone capsule, after 3 months, serum creatinine(Scr), calcium(Ca), phosphorus(P), serum albumin(Alb), total cholesterol(CHOL), triglyceride (TG), intact parathyroid hormone (iPTH), serum FGF23, Klotho protein, TGF-β1, NF-κB, 24 hour urinary protein quantitative and CIMT were compared between the two groups, and selected 35 healthy volunteers as healthy control group. **Results** The treatment group had lower levels of CHOL、TG、serum TGF-β1、NF-κB、FGF23 and urinary protein quantitative, higher levels of Klotho protein, can inhibit CIMT thickening, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). Spearman correlation coefficient showed that CIMT was positively correlated with urinary protein quantitative and FGF23 levels ( $P<0.05$ ), negatively correlated with Klotho protein ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Tanshinone capsule can reduce CIMT and inhibit vascular calcification by regulating the FGF23-Klotho axis, may be associated with TGF-β1/NF-κB pathway.

**KEY WORDS:** Tanshinone capsule; diabetic nephropathy; fibroblast growth factor 23; Klotho; vascular calcification