

盐酸二甲双胍、食物和乙醇对桑枝总生物碱药代动力学的影响

赵 吭^{1,2,3}, 冯 遇⁴, 纪文明¹, 王 丽⁴, 刘志华⁴, 于敬涵^{1,2,3}, 程佳玲^{1,2,3},
叶 军^{1,2,3}, 夏学军^{1,2,3*}, 刘玉玲^{1,2,3}

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050; 2. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050; 3. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 药物传输技术及新型制剂北京市重点实验室, 北京 100050; 4. 北京五和博澳药业有限公司, 北京 102600)

摘要: 桑枝总生物碱 (SZ-A) 是来源于桑枝的多羟基生物碱有效组分, 用于治疗 2 型糖尿病 (T2DM), 口服后除在小肠发挥糖苷酶抑制剂作用外, 还可吸收入血, 广泛分布于糖尿病相关靶器官, 发挥多重药理作用。阐明 SZ-A 可能存在的药代动力学影响因素, 如药物相互作用、食物及乙醇对 SZ-A 吸收的影响等, 对其临床合理用药十分重要, 然而这方面的研究却十分有限。因此, 本研究首先进行了 SD 大鼠灌胃给药 SZ-A (50 mg·kg⁻¹) 与盐酸二甲双胍 (200 mg·kg⁻¹) 之间的药代动力学相互作用研究。然后, 以大鼠空腹给药 SZ-A (50 mg·kg⁻¹) 为对照, 研究了食物 (标准饲料) 对 SZ-A 药代动力学的影响。最后, 以大鼠给药 SZ-A (50 mg·kg⁻¹) 水溶液为对照, 考察了 SZ-A 不同浓度的乙醇溶液的药代动力学特征, 评价乙醇对 SZ-A 生物吸收的影响。结果表明, SZ-A 与盐酸二甲双胍联合给药后没有产生明显的药代动力学相互作用。标准食物对 SZ-A 的药代特征几乎没有影响。乙醇延缓了 SZ-A 的吸收, 使 SZ-A 的 C_{max} 显著降低, 且乙醇浓度越高降低程度越大, 但是 AUC_{0-t} 没有显著性差异。本研究结果为 SZ-A 的临床合理用药提供了更多数据支持。所有动物实验方案均经康泰医学检验服务河北有限公司 (中国河北) 伦理委员会批准 (批准号: MDL2022-01-17-1)。

关键词: 桑枝总生物碱; 盐酸二甲双胍; 药物相互作用; 药代动力学; 食物和乙醇

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)12-3674-10

Pharmacokinetic effects of metformin hydrochloride, food and alcohol on Ramulus Mori (Sangzhi) alkaloids

ZHAO Hang^{1,2,3}, FENG Yu⁴, JI Wen-ming¹, WANG Li⁴, LIU Zhi-hua⁴, YU Jing-han^{1,2,3},
CHENG Jia-ling^{1,2,3}, YE Jun^{1,2,3}, XIA Xue-jun^{1,2,3*}, LIU Yu-ling^{1,2,3}

(1. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 3. Beijing Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Novel Formulation, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 4. Beijing Wehand-Bio Pharmaceutical Co., Ltd., Beijing 102600, China)

Abstract: Ramulus Mori (Sangzhi) alkaloids (SZ-A) are a group of polyhydroxy alkaloids extracted and isolated from the traditional Chinese medicine mulberry twig, which is mainly used for the treatment of type 2 diabetes mellitus (T2DM). In addition to acting as a glycosidase inhibitor in the small intestine after oral administration, SZ-A can also be absorbed into blood and widely distributed to target organs related to diabetes,

收稿日期: 2023-03-26; 修回日期: 2023-04-26.

基金项目: 中国医学科学院创新工程项目 (2022-I2M-2-002).

*通讯作者 Tel: 86-10-83160332, E-mail: xjxia@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0354

exerting multiple pharmacological effects. It is important to elucidate the possible pharmacokinetic influences of SZ-A for its clinical rational applications, such as drug interactions, the effects of food and alcohol on the absorption of SZ-A. However, studies in this area are limited. Therefore, the pharmacokinetic interactions between orally administrated SZ-A ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and metformin hydrochloride (Met, $200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) in Sprague-Dawley (SD) rats were examined. Then, the effect of food (standard feed) on the pharmacokinetics of SZ-A was investigated using fasting administration of SZ-A ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) in rats as a control. Finally, we investigated the pharmacokinetic characteristics of SZ-A ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) in different concentrations alcohol solutions using aqueous solution of SZ-A administered to rats as a control to evaluate the effect of alcohol on the bioabsorption of SZ-A. The results showed no significant pharmacokinetic interactions between SZ-A and Met after combination treatment. The standard feed had little effect on the pharmacokinetic profile of SZ-A. Alcohol retarded the absorption of SZ-A, resulting in a significant decrease in the C_{\max} of SZ-A. The decrease was greater at higher alcohol concentrations; however, no significant difference was observed in the AUC_{0-t} . These results support the clinical rational applications of SZ-A. All animal protocols were approved by the Ethics Committee of Kangtai Medical Laboratory Service Hebei Co., Ltd. (Hebei, China) (No. MDL2022-01-17-1).

Key words: Ramulus Mori (Sangzhi) alkaloid; metformin hydrochloride; drug interaction; pharmacokinetics; food and alcohol

糖尿病是一种以高血糖为特征的代谢性疾病,其中90%以上为2型糖尿病(T2DM)^[1]。T2DM的发病机制复杂,通常涉及从食物的消化吸收到全身糖脂代谢的整个过程^[2-5]。T2DM的治疗,已从早期的单纯降糖,向安全降糖乃至临床综合获益转变^[6],对药物研发也提出更高的要求。来源于植物的天然药物具有多组分与多重药理作用优势,受到国内外广泛关注。

桑枝总生物碱(SZ-A)是从药用植物桑枝中提取而来的多羟基生物碱有效组分天然药物,桑枝提取物中总生物碱含量可达50%以上,主要活性成分包括1-脱氧野尻霉素(DNJ)、荞麦碱(FA)和1,4-双脱氧-1,4-亚氨基-D-阿拉伯糖醇(DAB),三者之和占总生物碱的80%以上,其中以DNJ为主(占50%以上)。SZ-A用于T2DM治疗,早期被发现的作用机制是选择性抑制小肠 α -葡萄糖苷酶^[7-11]。随着研究的不断深入,发现SZ-A能够吸收入血并广泛分布于肝、肾、胰岛、脂肪、动脉血管、肌肉等与糖尿病相关的靶组织^[12,13],能通过改善胰岛素抵抗、刺激胰岛素分泌^[14]、降低巨噬细胞炎症^[15]、调节肠道菌群^[16]、调节肝脏脂质代谢和氧化应激^[17,18]等作用机制治疗T2DM。SZ-A用于T2DM治疗的多重药理作用特点,为临床综合获益奠定了基础。

针对T2DM,临床上常采用药物联合治疗,以获得更好的治疗效果。然而,联合用药可能会产生药物相互作用,影响药物体内过程和安全有效性,因此需要对其进行科学合理的评估。其中,药代动力学相互作用评价是其重要组成部分。盐酸二甲双胍是最常见的联合用药。前期完成的SZ-A片随机双盲临床研究结果显示,对于盐酸二甲双胍控制不佳的患者,联合SZ-A片,可获得良好的治疗效果^[11]。但作为2020年获批上

市的药物,尚未开展SZ-A与盐酸二甲双胍联合用药的体内药代动力学相互作用的研究。除药物治疗外,生活方式也是T2DM发生发展过程中的重要影响因素,饮食和饮酒是生活方式的重要组成部分。食物和乙醇与T2DM及其并发症有着紧密联系^[19],并且能够通过多种方式影响药物的吸收、分布、代谢和/或排泄过程^[20-22],影响药物疗效和安全性,目前尚且缺乏食物和乙醇对SZ-A影响的报道。

因此,本研究拟根据SZ-A特点,利用液相色谱-质谱联用(LC-MS/MS)技术对灌胃给药后各时间点血浆中的DNJ、FA和DAB进行检测,并以此计算总生物碱的血药浓度。通过对主要活性成分DNJ和总生物碱的最大血药浓度(C_{\max})以及血药浓度-时间曲线下面积(AUC_{0-t})等基本药代参数的比较,考察SZ-A与盐酸二甲双胍联合用药对两者药代动力学特征的影响,并开展食物和乙醇对SZ-A药代动力学的影响研究。本研究结果可为SZ-A与盐酸二甲双胍在临床上的联合应用提供药代支持,更好地指导SZ-A临床合理用药。

材料与amp;方法

仪器 AB Sciex 4500液相色谱质谱联用仪(美国AB Sciex公司); SHZ-DIII型循环水式真空泵(上海予捷仪器有限公司); SD-9200H型超声波清洗器(北京中晟铭科技有限公司); SK8200LHC型超声波清洗机(上海科导超声仪器有限公司); SI-0256型涡旋仪(美国Scientific Industries公司); HD-2500D型多管漩涡混合仪(山东欧莱博仪器有限公司); 1-14型离心机(美国Sigma公司); 5452R型离心机(德国Eppendorf公司); XS105DU、XS205DU、MS104S型电子天平(瑞士

Mettler Toledo 公司)。

试剂 SZ-A 提取物 (批号 J202108007, 北京五和博澳药业股份有限公司生产部门提供); 盐酸二甲双胍原料药 (批号 D16GS171362, 上海源叶生物科技股份有限公司); 米格列醇对照品 [批号 HRSLW-DM, 含量: 99.1%, 梯希爱 (上海) 化成工业发展有限公司]; DNJ 对照品 (批号 20171024, 含量: 99.29%, 北京五和博澳药业有限公司); FA 对照品 (批号 16411, 含量: 100%, Med Chem Express 公司); DAB 对照品 (批号 128M4148V、0000161756, 含量: 100%, 美国 Sigma 公司); 盐酸二甲双胍标准品 (批号 100664-202106, 含量: 99.9%, 中国食品药品检定研究院); 盐酸二甲双胍- d_6 标准品 (批号 E0029823, 含量: 99.9%, 北京曼哈格生物科技有限公司; 批号 M206, 含量: 99.9%, 加拿大 CDN ISOTOPES 公司); 甲酸 (批号 185465, 88%)、甲醇 (批号 F22M47201) 和乙腈 (批号 217207、F22M3S203、F22M6E201、F22M6E202), 美国 Fisher Chemical 公司; 乙醇 (批号 B2205139, 西陇科学股份有限公司); 氨水 (批号 20140720, 北京化工厂有限责任公司)。本研究使用色谱级乙腈和甲醇, 试验中涉及的其他化学品和试剂均为分析纯。

实验动物 SPF 级 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 雌雄各半, 体重 180~220 g, 斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 许可证号 SCXK (京) 2019-0010; 北京华阜康生物科技股份有限公司, 许可证号 SCXK (京) 2019-0008。

SZ-A 与盐酸二甲双胍联合用药的药代动力学研究 24 只 SD 大鼠, 随机分为 3 组, 每组 8 只, 雌雄各半, 分别是 SZ-A 组、盐酸二甲双胍组 (简称为 Met 组) 和 SZ-A 与盐酸二甲双胍联合用药组 (简称为 SZ-A+Met 组), 给药前禁食 12 h。3 组大鼠分别灌胃给予 SZ-A 水溶液 ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、盐酸二甲双胍水溶液 ($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和 SZ-A+盐酸二甲双胍水溶液 (SZ-A $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ +盐酸二甲双胍 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。

食物对 SZ-A 的药代动力学影响研究 12 只大鼠, 随机分为 2 组, 每组 6 只, 雌雄各半, 分别是空腹组和标准饲料组。空腹组大鼠给药前禁食 12 h, 标准饲料组大鼠维持标准饲料喂养, 2 组大鼠均灌胃给予 SZ-A 水溶液 ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。

乙醇对 SZ-A 的药代动力学影响研究 18 只大鼠, 随机分为 3 组, 每组 6 只, 雌雄各半, 分别是水组、5% 乙醇组和 40% 乙醇组, 给药前禁食 12 h。3 组大鼠分别灌胃给予 SZ-A 水溶液、SZ-A 5% 乙醇溶液和 SZ-A 40% 乙醇溶液 (SZ-A 分别溶于水、5% 乙醇和 40% 乙醇中, 给药剂量为 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。

动物采血及处理 所有大鼠在给药后 5、15、30、

45 min 和 1、2、4、8 和 24 h 通过眼眶静脉丛采集血样 (约 0.3 mL), 肝素抗凝, 血样以 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上层血浆分析。动物实验操作过程均依照中国医学科学院北京协和医学院《药物研究所动物实验中心标准操作规程》及实验动物管理与动物福利委员会的要求执行。所有动物实验方案均经康泰医学检验服务河北有限公司 (中国河北) 伦理委员会批准 (批准号: MDL2022-01-17-1)。

SZ-A 组分血药浓度测定

色谱条件 色谱柱为 XBridge™ Amide 柱 ($150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $3.5 \mu\text{m}$, Waters); 流动相 A 相为水 (含 0.1% 氨水), B 相为乙腈, 梯度洗脱: 0~4.0 min, 65% B; 4.0~7.0 min, 43% B; 7.0~13.0 min, 65% B; 流速为 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温为 $35 \text{ }^\circ\text{C}$; 进样器温度为 $15 \text{ }^\circ\text{C}$; 进样量 $5 \mu\text{L}$ 。

质谱条件 离子源: 电喷雾离子源; 入口电压: 10.0 eV ; 碰撞室出口电压: 6.0 eV ; 帘气: $35.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 碰撞气: $9.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 离子喷雾电压: 5500 eV ; 离子化温度: $500 \text{ }^\circ\text{C}$; 雾化气: $55.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 辅助气: $50.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 扫描离子模式: 正离子; 扫描方式: 多反应监测; DNJ、FA、DAB 和内标米格列醇用于定量分析的反应离子及其最优的去簇电压和碰撞能分别为: m/z 164.3→69.0 (去簇电压: 70 eV ; 碰撞能: 27 eV), m/z 148.2→112.1 (去簇电压: 56 eV ; 碰撞能: 18 eV), m/z 134.3→68.1 (去簇电压: 55 eV ; 碰撞能: 25 eV), m/z 208.3→146.1 (去簇电压: 70 eV ; 碰撞能: 27 eV)。

血浆样品处理 取大鼠血浆 $50 \mu\text{L}$, 加入 80% 甲醇溶液 $10 \mu\text{L}$ 和蛋白沉淀溶液 [乙腈-甲醇 (5:2, 含 0.1% 甲酸) 溶液, 含内标米格列醇 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$] $200 \mu\text{L}$, 涡旋混合 2 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 放置 10 min, $14000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液 $100 \mu\text{L}$, 加入 75% 乙腈 (含 0.1% 甲酸) 溶液 $100 \mu\text{L}$, 涡旋混合 1 min, $14000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清液进样测定。

二甲双胍血药浓度测定

色谱条件 色谱柱为 UPLC BEHAmide 柱 ($150 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}$, $1.7 \mu\text{m}$, 美国 Waters 公司); 流动相: $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵-乙腈 (30:70, 含 0.1% 甲酸); 流速: $0.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温为 $30 \text{ }^\circ\text{C}$; 进样器温度为 $15 \text{ }^\circ\text{C}$; 进样量 $2 \mu\text{L}$ 。

质谱条件 离子源: 电喷雾离子源; 入口电压: 10.0 eV ; 碰撞室出口电压: 6.0 eV ; 帘气: $10.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 碰撞气: $9.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 离子喷雾电压: 5500 eV ; 离子化温度: $500 \text{ }^\circ\text{C}$; 雾化气: $55.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 辅助气: $50.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 扫描离子模式: 正离子; 扫描方式: 多反应监测; 用于定量分析的反应离子及其最优去簇电压和碰撞能分别为: 二甲双胍 (m/z 130.4→60.0, 去簇电压: 50 eV , 碰撞能: 18 eV)、二甲双胍- d_6 (m/z 136.5→60.2, 去簇电压:

30 eV, 碰撞能: 20 eV)。

血浆样品处理 取大鼠血浆 50 μL , 加入内标二甲双胍- d_6 工作液 (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 5 μL 和蛋白沉淀溶液 [乙腈 (含 0.1% 甲酸) 溶液] 200 μL , 涡旋混合 2 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 10 min, 13 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液 50 μL , 加入 70% 乙腈 (含 0.1% 甲酸) 溶液 450 μL , 涡旋混合 1 min, 13 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清液进样测定。

结果统计与分析 数据采用 DAS 3.2.8 (中国药理学学会数学药理委员会, 中国北京) 中非房室模型拟合分析, 计算 DNJ、FA、DAB 和总生物碱的药代动力学参数, 包括血浆中药物的半衰期 ($t_{1/2}$)、达峰时间 (t_{max})、平均滞留时间 (MRT)、表观分布容积 (V_2)、清除率 (CL_Z)、血浆药物峰值浓度 (C_{max}) 和药时曲线下面积 (AUC) 等。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间数据比较采用 Student's t 检验, 当 $P < 0.05$ 时表示差异具有统计学意义。

结果

1 LC-MS/MS 分析方法的验证

SZ-A 的方法验证结果表明, 血浆中的内源性物质对 DNJ、FA、DAB 和米格列醇的检测无明显干扰 (图 1A~C), 检测无残留。大鼠血浆中 DNJ、FA 和 DAB 分别在 50~5 000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、25~2 500 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 25~2 500 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的浓度内线性良好 ($r > 0.99$)。定量下限和质控样品的日内和日间准确度在 90.73%~104.22% 之间, 日内和日间精密度的 RSD 值均小于 15% (1.43%~8.63%), 方法的准确度和精密度良好。相对基质效应 RSD 值均小于 15% (3.32%~10.49%), 方法的基质效应良好。DNJ、FA、DAB 的提取回收率在 88.96%~99.19% 之间, RSD 值均小于 15% (1.67%~6.82%), 内标米格列醇的提取回收率为 97.24%, RSD 值为 5.62%, 提取方法稳定可靠。未处理的含药血浆样品在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 反复冻融 3 次和处理后的样品在进样器中放置 48 h、4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 48 h, 血浆中的 DNJ、FA、DAB 的准确度均在 91.21%~107.02% 之间, RSD 值均小于 15% (0.91%~5.82%), 稳定性良好。浓度超过定量上限的含药血浆稀释 2 倍、5 倍和 10 倍后, 血浆中 DNJ、FA 和 DAB 准确度 87.09%~114.75% 之间, RSD 值均小于 15% (1.36%~5.28%), 提示含药血浆经空白血浆稀释 2 倍、5 倍和 10 倍后不影响测定结果。

盐酸二甲双胍的方法验证结果表明, 大鼠血浆中的内源性物质对二甲双胍和二甲双胍- d_6 的测定没有影响 (图 1D~F), 检测无残留。二甲双胍在 50~20 000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内的线性良好 ($r > 0.99$)。定量下限和质控样品的日内和日间准确度 96.13%~106.86% 之间, 日内和日间精密度的 RSD 值均小于 15% (3.82%~

10.18%), 方法的准确度和精密度良好。相对基质效应的 RSD 值均小于 15% (5.93%~9.01%), 方法的基质效应良好。二甲双胍的提取回收率在 87.10%~97.64% 之间, RSD 值均小于 15% (6.97%~12.71%), 内标二甲双胍- d_6 的提取回收率为 96.40%, RSD 值为 9.32%, 提取方法稳定可靠。未处理的含药血浆样品在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 反复冻融 3 次和处理后的样品在进样器中放置 48 h、4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 48 h, 血浆中的二甲双胍的准确度均在 101.91%~111.65% 之间, RSD 值均小于 15% (1.78%~12.55%), 稳定性良好。浓度超过定量上限的含药血浆稀释 2 倍后, 血浆中二甲双胍的准确度为 89.17%, RSD 值为 5.09%, 提示含药血浆经空白血浆稀释 2 倍后不影响测定结果。

以上结果表明, 建立的方法灵敏、精密、准确、稳定, 可用于检测大鼠血浆中的 SZ-A 组分和二甲双胍。

2 SZ-A 与盐酸二甲双胍联合用药的药代动力学研究

对 SZ-A 组和 SZ-A+Met 组大鼠血浆中各时间点 DNJ、FA 和 DAB 的浓度进行检测, 并以三者浓度之和计算总生物碱浓度。DNJ、FA、DAB 和总生物碱的血药浓度-时间曲线见图 2A、B。口服给药后, 三种生物碱吸收迅速 (t_{max} 约为 0.5 h), 并从血浆中快速清除, 三种生物碱的药代动力学特征基本一致。当 SZ-A 与盐酸二甲双胍联合用药时, 主要活性成分 DNJ 和总生物碱的药代动力学特征基本保持不变。DNJ 和总生物碱的主要药代动力学参数见表 1。DNJ 和总生物碱的 C_{max} 和 AUC_{0-t} 对比柱形图见图 2C。SZ-A 组和 SZ-A+Met 组 DNJ 的 C_{max} 分别为 (7 075.56 \pm 1 640.33) 和 (6 827.97 \pm 2 864.74) $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, AUC_{0-t} 分别为 (12 566.48 \pm 3 471.45) 和 (15 497.29 \pm 4 888.10) $\text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$; 总生物碱的 C_{max} 分别为 (9 939.33 \pm 1 696.85) 和 (9 193.77 \pm 3 629.69) $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, AUC_{0-t} 分别为 (17 598.42 \pm 3 655.03) 和 (20 742.32 \pm 6 291.60) $\text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。两组 DNJ 及总生物碱的 C_{max} 和 AUC_{0-t} 之间的差异均无统计学意义。

对 Met 组和 SZ-A+Met 组大鼠血浆中各时间点的二甲双胍浓度进行检测。盐酸二甲双胍的血药浓度-时间曲线及 C_{max} 和 AUC_{0-t} 对比柱形图见图 3, 盐酸二甲双胍的主要药代动力学参数见表 2。结果表明, 盐酸二甲双胍口服后的吸收和消除速度均慢于 SZ-A, 与 SZ-A 联用后, 血药浓度-时间曲线无明显变化。与 Met 组比, SZ-A+Met 组盐酸二甲双胍的 C_{max} [从 (14 519.47 \pm 2 989.19) 变为 (12 926.71 \pm 3 611.04) $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$] 和 AUC_{0-t} [从 (55 021.49 \pm 11 754.85) 变为 (66 256.29 \pm 22 531.93) $\text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$], 均无显著差异。以上结果提示 SZ-A 和盐酸二甲双胍联合用药后基本没有药代动力学相互作用。

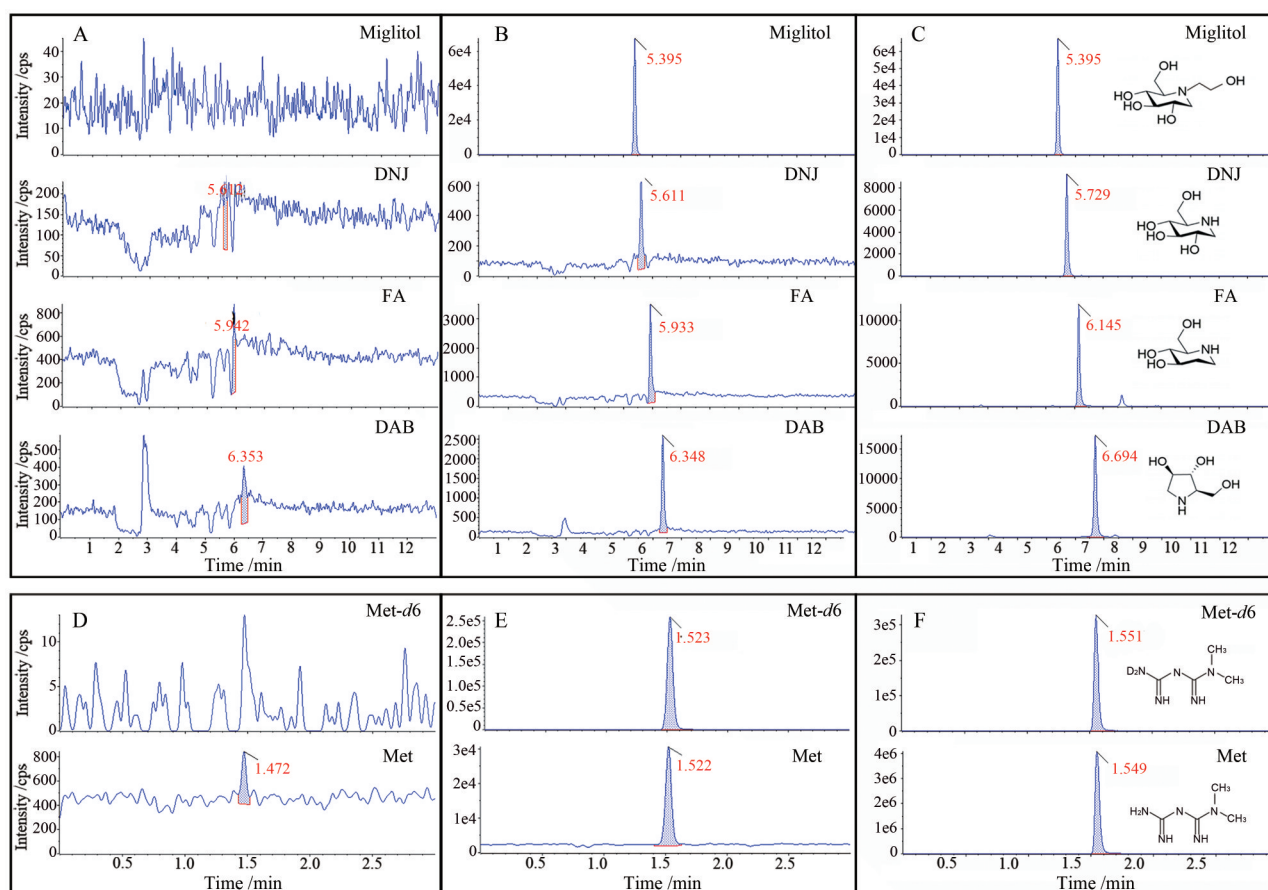


Figure 1 Typical multiple reaction monitoring (MRM) chromatograms for (A) blank plasma, (B) blank plasma spiked with 1-deoxynojirymycin (DNJ), fagomine (FA), 1,4-dideoxy-1,4-imino-*D*-arabinitol (DAB), and miglitol, and (C) plasma sample after oral administration of 50 mg·kg⁻¹ Ramulus Mori (Sangzhi) alkaloids (SZ-A). Typical MRM chromatograms for (D) blank plasma, (E) blank plasma spiked with metformin (Met) and metformin-*d*₆ (Met-*d*₆), and (F) plasma sample after oral administration of metformin hydrochloride (Met, 200 mg·kg⁻¹)

Table 1 Pharmacokinetic parameters of DNJ and total alkaloids in rats after oral administration of SZ-A (50 mg·kg⁻¹) without and with Met (200 mg·kg⁻¹). And mean (± SD) pharmacokinetic parameters of Met in rats after oral administration of Met (200 mg·kg⁻¹) without and with SZ-A (50 mg·kg⁻¹) (*n* = 8, $\bar{x} \pm s$, half male and half female). ***P* < 0.01 vs without Met group

Parameter	DNJ		Total alkaloids	
	Without Met	With Met	Without Met	With Met
<i>t</i> _{1/2} /h	1.07 ± 0.04	2.25 ± 2.05	1.04 ± 0.03	1.93 ± 1.28
<i>t</i> _{max} /h	0.63 ± 0.33	0.56 ± 0.12	0.53 ± 0.39	0.56 ± 0.12
MRT _{0-t} /h	1.51 ± 0.42	3.28 ± 1.52**	1.52 ± 0.46	3.06 ± 1.31**
<i>V</i> _z /L·kg ⁻¹	4.47 ± 1.30	7.38 ± 6.01	4.41 ± 0.84	7.06 ± 4.38
CL _z /L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	2.88 ± 0.76	2.32 ± 0.53	2.93 ± 0.50	2.55 ± 0.58
<i>C</i> _{max} /ng·mL ⁻¹	7 075.56 ± 1 640.33	6 827.97 ± 2 864.74	9 939.33 ± 1 696.85	9 193.77 ± 3 629.69
AUC _{0-t} /ng·h·mL ⁻¹	12 566.48 ± 3 471.45	15 497.29 ± 4 888.10	17 598.42 ± 3 655.03	20 742.32 ± 6 291.60

3 食物对SZ-A的 药代动力学影响研究

空腹组和标准饲料组 DNJ、FA、DAB 和总生物碱的药时曲线及 *C*_{max} 和 AUC_{0-t} 对比柱形图见图 4, DNJ 和总生物碱的主要药代动力学参数见表 3。结果表明, 与空腹组相比, 标准饲料组的 DNJ 和总生物碱的血浆浓度-时间曲线更加平缓; DNJ 的 *C*_{max} 由 (12 033.91 ± 6 612.72) 变为 (6 966.84 ± 1 974.98) ng·mL⁻¹, AUC_{0-t} 由 (24 212.55 ± 14 408.75) 变为 (21 862.90 ± 12 355.53)

ng·h·mL⁻¹; 总生物碱的 *C*_{max} 由 (15 624.25 ± 8 230.85) 变为 (10 633.92 ± 2 926.25) ng·mL⁻¹, AUC_{0-t} 由 (31 379.39 ± 18 277.43) 变为 (32 999.38 ± 17 647.60) ng·h·mL⁻¹。然而, 这些变化均不具有统计学意义。提示与空腹相比, 餐后给药时 SZ-A 在大鼠体内的药代动力学特征没有明显变化, 标准食物并不影响 SZ-A 的吸收和体内暴露。

4 乙醇对SZ-A的 药代动力学影响研究

水组、5% 乙醇组和 40% 乙醇组 DNJ 和总生物碱

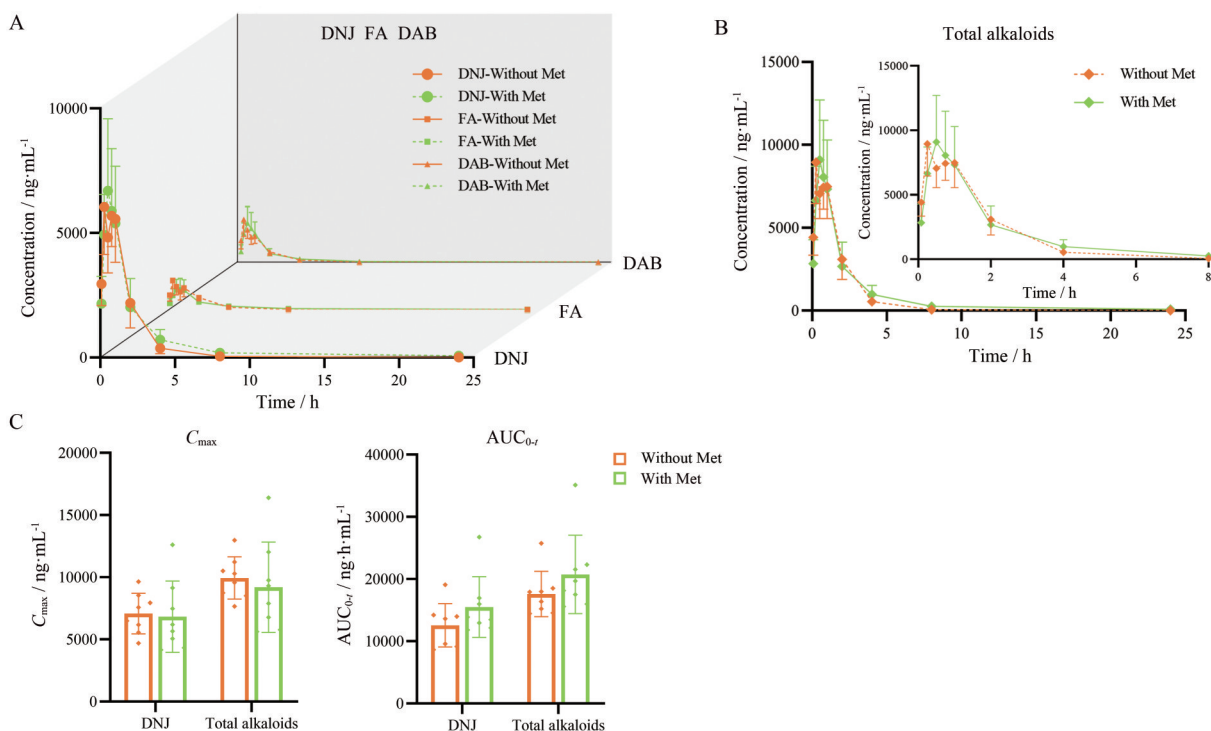


Figure 2 The plasma concentration-time curves of DNJ, FA, DAB (A) and total alkaloids (B) in rats after oral administration of SZ-A ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) without and with Met ($200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), and the comparison of C_{max} and AUC_{0-t} histogram of DNJ and total alkaloids (C). $n = 8$, $\bar{x} \pm s$ (half male and half female)

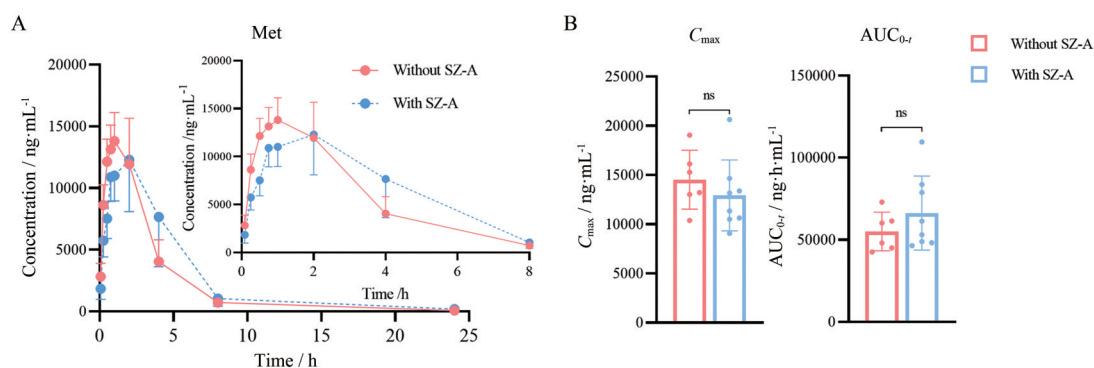


Figure 3 The plasma concentration-time curves of Met (A) in rats after oral administration of Met ($200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) without and with SZ-A ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), and the comparison of C_{max} and AUC_{0-t} histogram (B). $n = 8$, $\bar{x} \pm s$ (half male and half female). ^{ns}No significantly different from without SZ-A group

Table 2 Pharmacokinetic parameters of Met in rats after oral administration of Met ($200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) without and with SZ-A ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). $n = 8$, $\bar{x} \pm s$ (half male and half female). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs without SZ-A group

Parameter	Without SZ-A	With SZ-A
$t_{1/2}$ /h	1.96 ± 1.25	$3.23 \pm 0.86^*$
t_{max} /h	1.13 ± 0.44	$1.72 \pm 0.53^*$
MRT _{0-t} /h	3.03 ± 0.45	$3.96 \pm 0.53^{**}$
V_z /L·kg ⁻¹	9.98 ± 5.40	15.21 ± 6.31
CL _z /L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	3.76 ± 0.78	3.25 ± 0.92
C_{max} /ng·mL ⁻¹	$14\ 519.47 \pm 2\ 989.19$	$12\ 926.71 \pm 3\ 611.04$
AUC_{0-t} /ng·h·mL ⁻¹	$55\ 021.49 \pm 11\ 754.85$	$66\ 256.29 \pm 22\ 531.93$

的药时曲线及 C_{max} 和 AUC_{0-t} 对比柱形图见图5。结果表明,乙醇浓度越高,DNJ和总生物碱的血药浓度-时间曲线越平缓,峰值浓度越低。DNJ和总生物碱的主要药代动力学参数见表4。与水组相比,5%和40%乙醇组DNJ的 C_{max} 均显著降低 [分别从 ($8\ 773.10 \pm 682.47$) 降至 ($7\ 148.90 \pm 1\ 458.27$) 和 ($5\ 069.91 \pm 667.65$) ng·mL⁻¹], 而5%和40%乙醇组的总生物碱 C_{max} 分别从 ($12\ 758.96 \pm 1\ 826.10$) 降至 ($10\ 361.92 \pm 2\ 036.45$) 和 ($6\ 297.63 \pm 687.17$) ng·mL⁻¹, 但只有40%乙醇组有显著性差异。与水组相比,5%和40%乙醇组

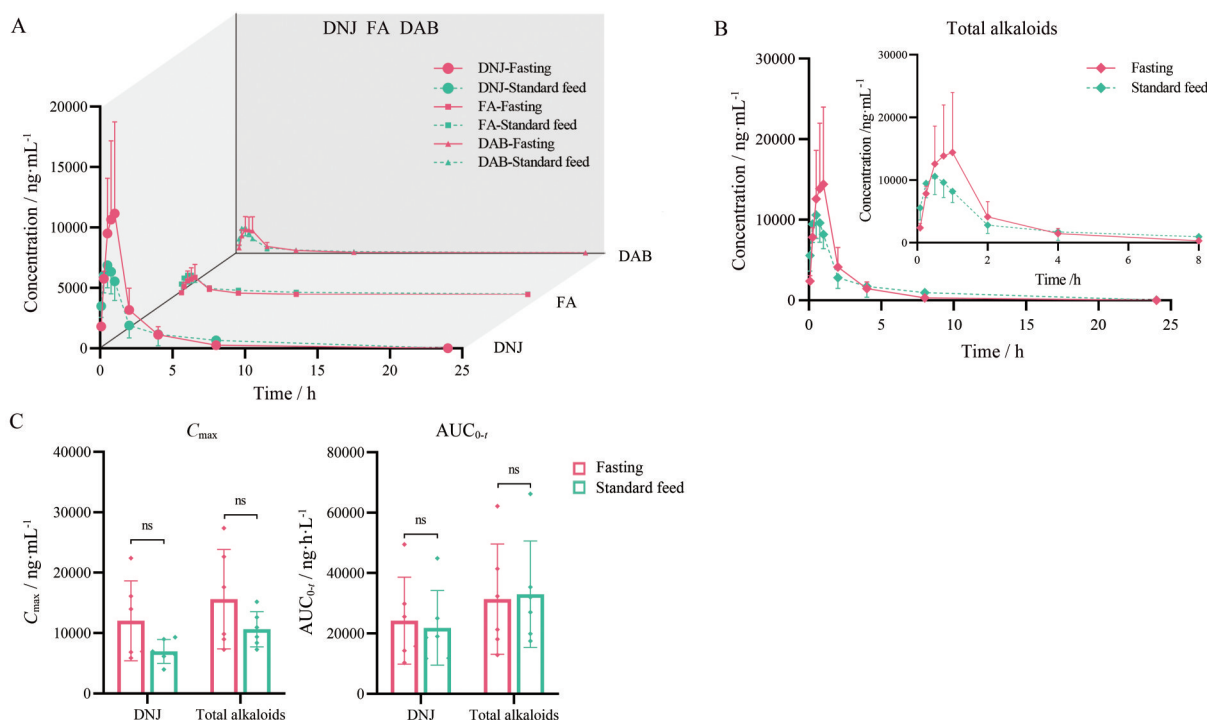


Figure 4 The plasma concentration-time curves of DNJ, FA, DAB (A) and total alkaloids (B) in rats after oral administration of SZ-A (50 mg·kg⁻¹) in fasting and standard feed group, and the comparison of C_{max} and AUC_{0-t} histogram of DNJ and total alkaloids (C). *n* = 6, $\bar{x} \pm s$ (half male and half female). ^{ns}No significantly different from fasting group

Table 3 Pharmacokinetic parameters of DNJ and total alkaloids in rats after oral administration of SZ-A (50 mg·kg⁻¹) in fasting and standard feed group (*n* = 6, $\bar{x} \pm s$, half male and half female). **P* < 0.05 vs fasting group

Parameter	DNJ		Total alkaloids	
	Fasting	Standard feed	Fasting	Standard feed
<i>t</i> _{1/2} /h	1.01 ± 0.05	1.05 ± 0.05	0.98 ± 0.03	2.49 ± 1.48*
<i>t</i> _{max} /h	0.79 ± 0.25	0.54 ± 0.10*	0.71 ± 0.33	0.54 ± 0.10
MRT _{0-t} /h	2.12 ± 0.42	2.94 ± 1.61	2.06 ± 0.46	3.23 ± 1.23
<i>V</i> _z /L·kg ⁻¹	2.72 ± 1.55	2.94 ± 1.42	2.97 ± 1.67	6.01 ± 3.75
CL _z /L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	1.83 ± 0.96	1.92 ± 0.85	2.09 ± 1.14	1.82 ± 0.77
C _{max} /ng·mL ⁻¹	12 033.91 ± 6 612.72	6 966.84 ± 1 974.98	15 624.25 ± 8 230.85	10 633.92 ± 2 926.25
AUC _{0-t} /ng·h·mL ⁻¹	24 212.55 ± 14 408.75	21 862.90 ± 12 355.53	31 379.39 ± 18 277.43	32 999.38 ± 17 647.60

Table 4 Pharmacokinetic parameters of DNJ and total alkaloids in rats after oral administration of SZ-A (50 mg·kg⁻¹) in H₂O, 5%, and 40% alcohol group (*n* = 6, $\bar{x} \pm s$, half male and half female). **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 vs H₂O group

Parameter	DNJ			Total alkaloids		
	H ₂ O	5% Alcohol	40% Alcohol	H ₂ O	5% Alcohol	40% Alcohol
<i>t</i> _{1/2} /h	1.15 ± 0.04	1.19 ± 0.25	1.14 ± 0.22	1.12 ± 0.04	1.18 ± 0.27	1.12 ± 0.23
<i>t</i> _{max} /h	0.42 ± 0.20	0.46 ± 0.19	0.42 ± 0.20	0.38 ± 0.21	0.46 ± 0.10	0.33 ± 0.13
MRT _{0-t} /h	0.94 ± 0.14	1.94 ± 0.64**	3.65 ± 1.59**	0.93 ± 0.17	1.86 ± 0.63**	3.71 ± 1.54**
<i>V</i> _z /L·kg ⁻¹	5.65 ± 1.21	4.30 ± 1.11	4.58 ± 1.93	5.85 ± 0.89	4.60 ± 1.27	5.02 ± 2.19
CL _z /L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	3.41 ± 0.64	2.64 ± 0.87	2.71 ± 0.56	3.61 ± 0.44	2.87 ± 0.99	3.01 ± 0.61
C _{max} /ng·mL ⁻¹	8 773.10 ± 682.47	7 148.90 ± 1 458.27*	5 069.91 ± 667.65***	12 758.96 ± 1 826.10	10 361.92 ± 2 036.45	6 297.63 ± 687.17***
AUC _{0-t} /ng·h·mL ⁻¹	10 283.48 ± 1 972.83	15 195.91 ± 8 738.82	12 951.26 ± 2 487.60	14 003.00 ± 1 593.92	20 822.54 ± 12 337.29	17 118.96 ± 3 135.17

DNJ和总生物碱的AUC_{0-t}均无明显变化。提示乙醇浓度越高, SZ-A的C_{max}降低程度越大, 但是AUC_{0-t}没有显著变化。

讨论

LC-MS/MS通常用于生物样品的分析。为了评价SZ-A和盐酸二甲双胍的药代动力学, 开发灵敏性和选

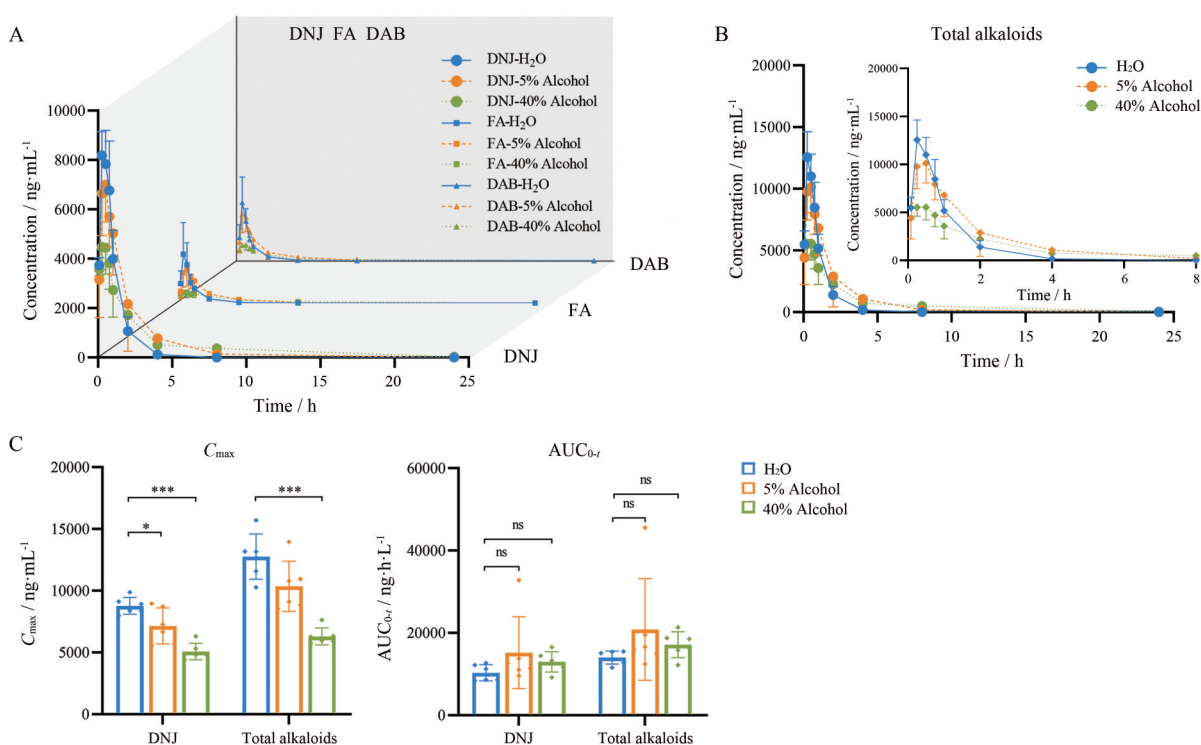


Figure 5 The plasma concentration-time curves of DNJ, FA, DAB (A) and total alkaloids (B) in rats after oral administration of SZ-A (50 mg·kg⁻¹) in H₂O, 5% alcohol, and 40% alcohol group, and the comparison of C_{max} and AUC_{0-t} histogram of DNJ and total alkaloids (C). $n = 6$, $\bar{x} \pm s$ (half male and half female). ^{ns}No significantly different from fasting group. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs H₂O group

择性高的LC-MS/MS方法具有重要意义。课题组前期建立了SZ-A的SD大鼠血浆分析方法以及盐酸二甲双胍的Beagle犬血浆分析方法^[23]。基于之前的方法,本研究首先探索了是否可以建立一种同时测定大鼠血浆中SZ-A组分和二甲双胍的分析方法。结果表明,使用亲水性氨基柱或酰胺柱时,碱性流动相有助于改善SZ-A组分的峰形,但不利于二甲双胍的出峰;酸性流动相改善了二甲双胍的峰形,但不利于SZ-A组分检测。当选择中性pH的流动相时,SZ-A组分和二甲双胍的峰形和选择性都较差,不能满足检测要求。因此,本研究选择分别采用两种分析方法检测大鼠血浆中的SZ-A组分和二甲双胍。课题组前期已经验证了建立的SZ-A和盐酸二甲双胍的分析方法。然而,在对SZ-A分析方法进行再验证的过程中,发现重复性差导致方法验证失败。因此,需要对该方法进行优化。首先,参考国内外文献,研究改变流动相是否能够使检测更加稳定,对流动相比例、水相中氨水浓度以及在水相中加入乙酸铵缓冲盐等方式进行了探索。结果发现,以上方式均未改善检测,且SZ-A中DNJ、FA和DAB的峰形、信号强度也不如原方法。然后,本研究改变了血浆样品的处理方法,结果发现,与简单的一次沉淀蛋白法相比,沉淀蛋白后取上清经稀释再次沉淀蛋白的方法能够使蛋白沉淀更完全,显著改善了基质效应和

提取回收率;在处理血浆样品所用溶剂中加入0.1%的甲酸有助于改善峰的形状和样品的稳定性。最后,为了保证检测的准确度和精密性,本研究缩小了DNJ、FA和DAB的线性范围,并将FA和DAB的线性浓度设置为DNJ线性浓度的1/2(SZ-A中FA和DAB的含量远低于DNJ)。本研究对优化后的SZ-A大鼠血浆方法进行了多次方法验证以确保重现性良好。对于盐酸二甲双胍的分析方法,当实验动物从Beagle犬改为SD大鼠时,需要对方法进行优化并完成验证。由于大鼠的可取血量远远小于犬,本研究将血浆样品预处理方法中血浆和所有溶剂的体积减小到原方法的一半,结果发现这种改变并不影响血浆中二甲双胍检测。

盐酸二甲双胍是一线抗糖尿病药物,用于单一疗法或与其他药物联合治疗T2DM已经超过了60载。随着对其研究的深入,发现除治疗糖尿病外,盐酸二甲双胍在减肥减重,改善血压和血脂和治疗多囊卵巢综合征(PCOS)^[24,25]方面也有一定的效果。盐酸二甲双胍还具有价格便宜、不良反应较小等优点,在临床上得到了广泛的应用。盐酸二甲双胍与其他药物如降糖药、降压药等合用都较为常见,相关研究也有很多。SZ-A和盐酸二甲双胍联合用药是治疗T2DM的一种选择。然而,有研究表明,作用于肠壁的药物(如 α -葡萄糖苷酶抑制剂)可能对盐酸二甲双胍的药代动力学

产生一定的影响,如阿卡波糖和米格列醇能够显著降低盐酸二甲双胍的 C_{\max} 和 AUC^[26-28]。相比之下,伏格列波糖对盐酸二甲双胍的药代动力学没有影响。这些研究说明,盐酸二甲双胍与不同药物联合用药时可能有不同的相互作用。因此,应该考察 SZ-A 和盐酸二甲双胍之间是否会产生药代动力学相互作用。本研究选择 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 SZ-A 和 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的盐酸二甲双胍来考察 SZ-A 与二甲双胍联合用药的药代动力学,剂量选择参考 SZ-A^[12,16,18,29] 和盐酸二甲双胍^[30,31] 的药效学和药代动力学研究中报道的剂量。在参数比较时,考虑到 C_{\max} 和 AUC 是药代动力学评价的终点指标,其中, C_{\max} 是反映药物吸收速率和吸收程度的重要指标, AUC 是评价药物吸收程度、反映暴露特性的重要指标,因此,本研究选择比较 C_{\max} 和 AUC 来评价药代动力学的变化。

在 SZ-A 的临床应用中,医生通常建议 T2DM 患者将药片嚼碎后与第一口或前几口食物一起服用,但 SZ-A 的药代研究通常是在动物空腹状态下进行的,缺乏食物影响的相关报道。此外,医生也建议患者健康标准饮食以更好控制血糖和预防并发症。因此,本研究选择标准饲料来模拟标准饮食,评价食物对 SZ-A 药代动力学的影响。然而,在现实生活中,人们可以选择不同类型的饮食。因此,高糖、高蛋白质和高脂肪的食物是否会影响 SZ-A 的药代动力学有待进一步研究。此外,还应该研究长期不同饮食习惯的影响。

饮酒在生活中比较常见,乙醇可能通过影响消化和吸收过程与药物产生药代动力学相互作用。此外,乙醇能够延缓胃排空,影响药物在小肠内的接触面积,从而影响药物的吸收^[32]。常见的酒主要包括啤酒、葡萄酒和烈酒。其中,大多数啤酒和醒过的葡萄酒的乙醇浓度在 5% 左右,烈酒的乙醇浓度在 40% 左右^[33],它们的乙醇浓度不同,对同服药物可能产生不同程度的影响。此外,国家药品监督管理局颁布的相关指导原则建议研究一般可选 5%、20% 和 40% 的乙醇^[34]。基于此,本文选择较低浓度 (5%) 和较高浓度 (40%) 来评价不同浓度的乙醇对 SZ-A 药代动力学的影响。通过进一步分析总生物碱的药代动力学参数发现,与水组相比,乙醇组的 MRT 增加,且 C_{\max} 的下降与 MRT_{0-t} 的增加呈现一定的相关性, MRT_{0-t} 增加越明显, C_{\max} 下降越大 (5% 和 40% 乙醇组 DNJ 的 C_{\max} 分别下降 18.51% 和 42.21%, MRT_{0-t} 分别增加 106.38% 和 288.30%; 总生物碱的 C_{\max} 分别下降 18.79% 和 50.64%, MRT_{0-t} 分别增加 100.00% 和 298.92%) (表 4)。提示乙醇可能会延长 SZ-A 在胃肠道的停留时间,延迟其吸收,乙醇浓度越高越明显。SZ-A 的药理作用可根据其是否进入血液循环分

为胃肠道中的作用 (抑制小肠 α -葡萄糖苷酶和调节肠道菌群等) 和吸收入血后 (改善胰岛素抵抗、促进葡萄糖刺激的胰岛素分泌、抗炎、抗氧化等) 的作用。虽然乙醇在胃肠道停留时间的延长可能有利于 SZ-A 在肠道中发挥 α -葡萄糖苷酶抑制作用,但也应关注 C_{\max} 的降低可能导致的对其在体内的其他治疗效果的影响。此外,饮酒可导致血糖波动,干扰机体的胰岛素代谢^[35,36],不利于 T2DM 的治疗。因此,应建议 T2DM 或其他代谢性疾病的患者尽量少饮酒,最好停止饮酒。

致谢: 感谢 SZ-A 的制造商 (广西五和博澳药业有限公司)。

作者贡献: 赵吭是本研究的实验设计者和实验研究的主要执行人,完成数据分析处理、论文初稿的写作;冯遇、纪文明、王丽、于敬涵、程佳玲参与实验研究;刘玉玲、夏学军、刘志华构思了这个项目并设计了研究思路、指导实验设计、数据分析、论文修改;叶军协助论文的修改。

利益冲突: 所有作者均声明不存在任何利益冲突。

References

- [1] Alam F, Islam MA, Kamal MA, et al. Updates on managing type 2 diabetes mellitus with natural products: towards antidiabetic drug development [J]. *Curr Med Chem*, 2018, 25: 5395-5431.
- [2] Sha W, Hu F, Xi Y, et al. Mechanism of ferroptosis and its role in type 2 diabetes mellitus [J]. *J Diabetes Res*, 2021, 2021: 9999612.
- [3] Defronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus [J]. *Med Clin North Am*, 2004, 88: 787-835.
- [4] Fletcher B, Gulanic M, Lamendola C. Risk factors for type 2 diabetes mellitus [J]. *J Cardiovasc Nurs*, 2002, 16: 17-23.
- [5] Artasensi A, Pedretti A, Vistoli G, et al. Type 2 diabetes mellitus: a review of multi-target drugs [J]. *Molecules*, 2020, 25: 1987.
- [6] Liu YL, Wang RY, Xia XJ, et al. Review of the research and development of Ramulus Mori (Sangzhi) alkaloids (I): technical barriers and large-scale development challenges in pharmaceutical research [J]. *Chin J Diabetes (中国糖尿病杂志)*, 2020, 28: 555-560.
- [7] Li HY, He QH, Li Q. Effect of Sangzhi alkaloids on glucose and lipid metabolism [J]. *Chin J Diabetes (中国糖尿病杂志)*, 2022, 30: 154-158.
- [8] Ye F, Shen Z, Xie M. Alpha-glucosidase inhibition from a Chinese medical herb (Ramulus Mori) in normal and diabetic rats and mice [J]. *Phytomedicine*, 2002, 9: 161-166.
- [9] Hansawasdi C, Kawabata J. α -Glucosidase inhibitory effect of mulberry (*Morus alba*) leaves on Caco-2 [J]. *Fitoterapia*, 2006, 77: 568-573.
- [10] Xing DJ, Xiang DY, Zhang CK. A review of the Ramulus Mori

- on its chemical and pharmacological studies [J]. *Mod Chin Med* (中国现代中药), 2014, 16: 957-960.
- [11] Li M, Huang X, Ye H, et al. Randomized, double-blinded, double-dummy, active-controlled, and multiple-dose clinical study comparing the efficacy and safety of mulberry twig (*Ramulus Mori*, Sangzhi) alkaloid tablet and acarbose in individuals with type 2 diabetes mellitus [J]. *Evid Based Complement Altern Med*, 2016, 2016: 7121356.
- [12] Yang S, Mi J, Liu Z, et al. Pharmacokinetics, tissue distribution, and elimination of three active alkaloids in rats after oral administration of the effective fraction of alkaloids from *Ramulus Mori*, an innovative hypoglycemic agent [J]. *Molecules*, 2017, 22: 1616.
- [13] Liu Z, Feng Y, Zhao H, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of *Ramulus Mori* (Sangzhi) alkaloids in rats and its effects on liver enzyme activity [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1136772.
- [14] Liu SN, Liu Q, Sun SJ, et al. Anti-diabetic effects of the fraction of alkaloids from *Ramulus Mori*, an innovative Sangzhi alkaloids as an α -glucosidase inhibitor [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2019, 54: 1225-1233.
- [15] Cao H, Ji W, Liu Q, et al. *Morus alba* L. (Sangzhi) alkaloids (SZ-A) exert anti-inflammatory effects via regulation of MAPK signaling in macrophages [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 280: 114483.
- [16] Liu Q, Liu S, Cao H, et al. *Ramulus Mori* (Sangzhi) alkaloids (SZ-A) ameliorate glucose metabolism accompanied by the modulation of gut microbiota and ileal inflammatory damage in type 2 diabetic KKAY mice [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 642400.
- [17] Sun QW, Lian CF, Chen YM, et al. *Ramulus Mori* (Sangzhi) alkaloids ameliorate obesity-linked adipose tissue metabolism and inflammation in mice [J]. *Nutrients*, 2022, 14: 5050.
- [18] Chen YM, Lian CF, Sun QW, et al. *Ramulus Mori* (Sangzhi) alkaloids alleviate high-fat diet-induced obesity and nonalcoholic fatty liver disease in mice [J]. *Antioxidants* (Basel), 2022, 11: 905.
- [19] Sonnenburg JL, Backhed F. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism [J]. *Nature*, 2016, 535: 56-64.
- [20] Koziolk M, Alcaro S, Augustijns P, et al. The mechanisms of pharmacokinetic food-drug interactions - a perspective from the UNGAP group [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2019, 134: 31-59.
- [21] Lennernas H. Ethanol-drug absorption interaction: potential for a significant effect on the plasma pharmacokinetics of ethanol vulnerable formulations [J]. *Mol Pharm*, 2009, 6: 1429-1440.
- [22] Fagerberg JH, Sjogren E, Bergstrom C. Concomitant intake of alcohol may increase the absorption of poorly soluble drugs [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2015, 67: 12-20.
- [23] Gong XF, Zhang D, Wang YR, et al. Effects of alcohol on release characteristics of metformin hydrochloride extended-release tablets *in vitro* and *in vivo* [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2019, 54: 47-52.
- [24] Zhao Q, He J. Efficacy and safety of metformin in pregnant women with polycystic ovary syndrome: a systematic review with meta-analysis of randomized and non-randomized controlled trials [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2022, 38: 558-568.
- [25] Shpakov AO. Improvement effect of metformin on female and male reproduction in endocrine pathologies and its mechanisms [J]. *Pharmaceuticals* (Basel), 2021, 14: 42.
- [26] Scheen AJ, Lefebvre PJ. Potential pharmacokinetics interference between α -glucosidase inhibitors and other oral antidiabetic agents [J]. *Diabetes Care*, 2002, 25: 247-248.
- [27] Scheen AJ, De Magalhaes AC, Salvatore T, et al. Reduction of the acute bioavailability of metformin by the α -glucosidase inhibitor acarbose in normal man [J]. *Eur J Clin Invest*, 1994, 24 (Suppl 3): 50-54.
- [28] Chiasson JL, Naditch L. The synergistic effect of miglitol plus metformin combination therapy in the treatment of type 2 diabetes [J]. *Diabetes Care*, 2001, 24: 989-994.
- [29] Lei L, Huan Y, Liu Q, et al. *Morus alba* L. (Sangzhi) alkaloids promote insulin secretion, restore diabetic β -cell function by preventing dedifferentiation and apoptosis [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 841981.
- [30] Lyu Y, Zhang Y, Yang M, et al. Pharmacokinetic interactions between metformin and berberine in rats: role of oral administration sequences and microbiota [J]. *Life Sci*, 2019, 235: 116818.
- [31] Quail MP, Melich DH, Jordan HL, et al. Toxicity and toxicokinetics of metformin in rats [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, 243: 340-347.
- [32] Fraser AG. Pharmacokinetic interactions between alcohol and other drugs [J]. *Clin Pharmacokinet*, 1997, 33: 79-90.
- [33] Roth W, Setnik B, Zietsch M, et al. Ethanol effects on drug release from verapamil meltrex, an innovative melt extruded formulation [J]. *Int J Pharm*, 2009, 368: 72-75.
- [34] Center for Drug Evaluation, NMPA. Technical guidelines for clinical pharmacokinetic studies of modified new drug release formulations [EB/OL]. 2022 [2023-03-27]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/a7b81292e7c15e331ece179580019112>.
- [35] Liu G, Li Y, Hu Y, et al. Influence of lifestyle on incident cardiovascular disease and mortality in patients with diabetes mellitus [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2018, 71: 2867-2876.
- [36] Van D. Diabetes mellitus and alcohol [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2004, 20: 263-267.