

UPLC-Q-TOF/MS^E技术分析鉴定 Zg02 在大鼠体内的代谢产物

张曼^{1,2}, 陈瑞¹, 胡克荣^{1,2}, 程瑶^{1,2}, 黄静^{2*}

(1. 贵州医科大学, 贵州省化学合成药物研发利用工程技术研究中心, 贵州 贵阳 550004;
2. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550004)

摘要: 本研究采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间-串联质谱 (UPLC-Q-TOF/MS^E) 技术对 SD 大鼠经灌胃新型胰岛素增敏剂 Zg02 (20 mg·kg⁻¹) 后所收集的血浆、尿液及粪便样品进行检测, 获得化合物的分子离子及质谱碎片离子信息, 并结合 UNIFI 软件, 对代谢产物进行快速分析。结果表明, 单次灌胃 Zg02 (20 mg·kg⁻¹) 后在大鼠体内共推测出 12 个代谢产物, 其中血浆、尿液、粪便中分别有 5、7、11 个代谢产物 (含交叉分析), 代谢途径主要为葡萄糖醛酸化、葡萄糖基化等结合反应。所有动物实验方案均获得贵州医科大学动物伦理委员会批准 (编号: 2100856)。

关键词: UPLC-Q-TOF/MS^E; 代谢产物; 大鼠体内

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)08-2305-08

Identification of Zg02 metabolites in rats by UPLC-Q-TOF/MS^E

ZHANG Man^{1,2}, CHEN Rui¹, HU Ke-rong^{1,2}, CHENG Yao^{1,2}, HUANG Jing^{2*}

(1. Guizhou Medical University, Guizhou Provincial Engineering Technology Research Center for Chemical Drug R & D, Guiyang 550004, China; 2. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

Abstract: In this study, plasma, urine and fecal samples were collected from rats after intragastric administration of novel insulin sensitizer Zg02 (20 mg·kg⁻¹). The ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight-tandem mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS^E) techniques was used to obtain the molecular ion and mass spectrometry fragment ion information of the compound, and the metabolites were quickly analyzed by combining with UNIFI metabolite software. The results showed that a total of 12 metabolites were inferred in rats after a single gavage of Zg02 (20 mg·kg⁻¹), including 5, 7 and 11 metabolites in plasma, urine and feces (including cross-analysis), and the metabolic pathways were mainly glucuronidation and glucosylation. All animal protocols were approved by the Animal Ethics Committee of Guizhou Medical University (No. 2100856).

Key words: UPLC-Q-TOF/MS^E; metabolite; rats *in vivo*

糖尿病 (diabetic mellitus, DM), 是一种以高血糖为指征的慢性代谢紊乱性疾病^[1-3]。据统计, 全球糖尿病患病率持续增大, 截至 2021 年, 全球 IFG (空腹血糖, 6.1~6.9 mmol·L⁻¹ [110~125 mg·dL⁻¹]) 患病率已达 5.8%, 预计 2045 年将增加到 6.5%^[4-6]。由于医疗技术的发展和降糖类创新药物的不断发现, 糖尿病的致死率呈下

降趋势^[7,8], 其中口服药物治疗是临床上最常用的方法^[9,10], 即口服降糖类药物是创新药物研发的热点之一^[11-13]。

新型四氢咪唑衍生物 Zg02 (图 1), 化学名称为 6-苄氧基-9-(4-氯苯甲酰基)-1,2,3,4-四氢咪唑-3-甲酸, 是课题组前期经合成工艺路线优化的具有良好胰岛素增敏活性的候选化合物^[14,15], 可通过激活 AMPK 信号通路降低小鼠的血糖^[16]。并且在前期体外稳定性研究中发现 Zg02 在体外血浆和人工肠液中均较稳定, 在人工胃液和大鼠肝微粒体中不稳定^[17,18]。此外, Zg02 具有

收稿日期: 2024-01-18; 修回日期: 2024-04-26.

基金项目: 贵州省科技计划项目 (黔科中引地 [2022] 4017); 贵州省教育厅服务“四新”“四化”科技攻关项目 (黔教技 [2022] 004).

*通讯作者 E-mail: 1104849720@qq.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0060

半衰期长 (6.46 h)、口服生物利用度低 (20.2%) 的特点^[19]。本研究建立 UPLC-Q-TOF/MS^E 分析方法, 检测 Zg02 在 SD 大鼠体内的代谢产物, 获得化合物的分子离子及质谱碎片离子信息, 初步确定了 Zg02 的代谢规律及相关代谢产物的结构, 为接下来的成药性筛选奠定了基础, 进一步推进候选化合物药物开发的进程。

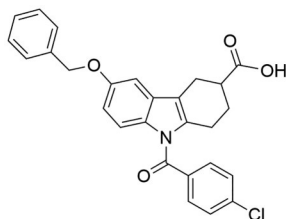


Figure 1 Structure of Zg02

材料与方法

仪器 UPLC-Q-TOF (型号 Xevo G2-XS, 美国 Waters 公司); 代谢笼 (意大利 Tecniplast 公司); 氮气吹扫仪 (型号 JN300-2, 苏州吉米诺仪器有限公司); 冷冻高速离心机 (型号 1730R) 和高速离心机 (型号 X1), 香港基因有限公司; 超声波清洗器 (型号 KH-600E, 昆山禾创超声仪器有限公司); 十万分之一电子天平 (型号 FA805N, 上海菁海仪器有限公司); 超低温保存箱 (型号: DW-86L486, 海尔有限公司) 等。

药品试剂 Zg02 原料药 (贵州医科大学药物化学重点实验室制备, 纯度 > 98%); 吡啶美辛 (大连美伦生物技术有限公司, 批号 J0526A5, 纯度 > 98%); 甲酸 (CNW Technologies, HPLC 级, 批号 X075K150), 甲醇、乙腈 (德国默克股份两合公司, 色谱纯); 水为屈臣氏蒸馏水; OASIS HLB 固相萃取 (SPE) 柱 (美国 Waters 公司)。

实验动物 清洁级 SD 大鼠 6 只, 雌雄各半, 体重 180~240 g, 鼠龄: 8~10 周, 大鼠购自贵州医科大学, 合格证号: SYXK (黔) 2018-0001。动物于动物房中饲养一周以适应环境。所有动物实验方案均获得贵州医科大学动物伦理委员会批准 (编号: 2100856)。

生物样品处理方法

血浆样品的处理 取混合各时间点的大鼠血浆 0.5 mL, 置于 2.0 mL EP 管中, 加入 1 mL 乙腈沉淀蛋白, 涡混震荡 10 min, 于 4 °C 下, 13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液, 于 37 °C 氮气下吹干。加入 200 μL 50% 甲醇水溶液 (1:1, v/v) 复溶样品, 涡混震荡 10 min, 4 °C 下 13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液 UPLC-Q-TOF/MS^E 进样分析。

尿液样品处理 取 HLB 固相萃取小柱, 加入 1 mL 甲醇, 再加 1 mL 水进行活化小柱后备用。将大鼠混合

尿液 1 mL 上样, 依次用 4 倍体积水和 4 倍体积甲醇进行洗脱, 收集甲醇洗脱液。将其置于 37 °C 氮气下吹干, 残留物用 600 μL 50% 甲醇水溶液 (1:1) 复溶, 涡混震荡 10 min, 4 °C 下 13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液 UPLC-Q-TOF/MS^E 进样分析。

粪便样品处理 收集的粪便低温烘干后, 称取粪便样本适量, 用 70% 的甲醇水溶液 (7:3) 以 1:10 (w/v) 的比例匀化, 制备成 10% 的匀浆, 超声 5 min, 13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后, 取上清液 1 mL 上样, 取 HLB 固相萃取小柱 (小柱预先活化平衡好备用), 依次用 4 倍体积水和 4 倍体积甲醇进行洗脱, 收集甲醇洗脱液。将其置于 37 °C 氮气下吹干, 残留物用 600 μL 50% 甲醇水溶液复溶, 4 °C 下 13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上层清液 UPLC-Q-TOF/MS^E 进样分析。

液相条件 色谱柱: Waters BEH C₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 柱; 流速 0.40 mL·min⁻¹; 进样量: 2 μL; 柱温: 40 °C; 流动相: 0.01% 甲酸水 (A)-0.01% 甲酸乙腈 (B), 梯度洗脱程序: 0~2 min, 5% B; 2~6 min, 5%~60% B; 6~10 min, 60%~98% B; 10~12 min, 98% B; 12~15 min, 98%~5% B。

质谱条件 电喷雾电离源 (ESI); 正模式采集 (positive mode): 毛细管电压 2.0 kV, 负模式采集 (negative mode): 毛细管电压 1.5 kV; 离子源 120 °C, 溶剂气温度 400 °C, 脱溶剂气流量 800 L·h⁻¹, 锥孔气流量 50 L·h⁻¹; 质谱数据采集及处理软件 MassLynx V4.1 工作站, 扫描方式 MS^E Continuum 模式。

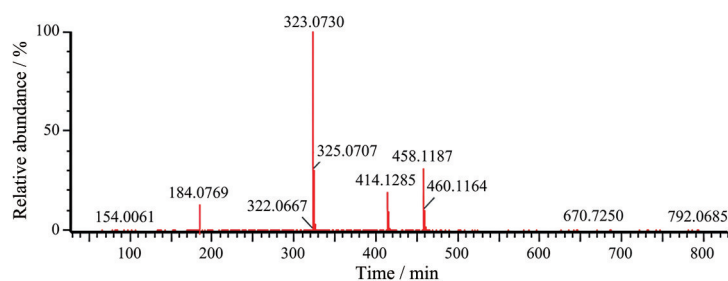
结果

1 Zg02 在灌胃给予大鼠后的体内代谢分析

通过 UPLC-Q-TOF/MS^E 对各生物样品进行检测, MS^E 采集方法可在一个质谱周期内进行高、低碰撞能量全扫描, 从而简便、快速地获得组分的母离子及子离子信息, 根据得到的质谱数据结合 UNIFI 代谢产物预测、筛查软件, 对 Zg02 的代谢产物进行快速分析。在 UNIFI 软件中, 将给药后的样品图谱扣除空白基质图谱后, 通过原形化合物 Zg02 建立的专属数据库显示出样品中特有质谱信息 (图 2), 在灌胃给药 Zg02 的大鼠血浆、尿液、粪便样品中检测出 12 个代谢产物, 其正、负模式下的基峰强度 (base peak intensity, BPI) 色谱图分别见图 3、4。各代谢产物的保留时间、结构组成、碎片离子、计算 *m/z* 等见表 1, 根据代谢产物结构推测其代谢途径, 如图 5, Zg02 由原型先转化为 M1、M2、M3 及 M7, 再以 M3 转化为 M4、M5 及 M6, 以 M7 转化为 M8、M9、M10、M11 及 M12。图 6 为主要代谢产物高、低能量质谱图, 结合图 2 可分析佐证各代谢产物结构。

Table 1 UPLC-Q-TOF MS^E detection of metabolites in plasma (P), urine (U), and feces (F) after 20 mg·kg⁻¹ dose in Zg02 rats (M₀: Prototypes of compounds)

No.	t _R /min	Ion mode	Formula	m/z (measured)	Error (ppm)	Fragment ion	Metabolite	Source
M ₀	6.25	[M-H] ⁻	C ₂₇ H ₂₂ ClNO ₄	458.117 2	1.5	186.092 3 323.073 0 414.126 6	Zg02	F, U, P
M1	4.62	[M+H] ⁺	C ₃₃ H ₃₂ ClNO ₉	622.182 5	-3.1	93.062 8 278.157 8 322.148 2 416.140 3	Zg02+C ₆ H ₁₀ O ₅	U
M2	4.52	[M-H] ⁻	C ₃₃ H ₃₄ ClNO ₁₀	634.176 2	-4.9	138.001 1 320.128 7 414.128 0 458.117 2	Zg02+C ₆ H ₈ O ₆	U
M3	5.82	[M-H] ⁻	C ₂₀ H ₁₆ ClNO ₄	368.070 5	4.1	137.988 3 230.081 7 324.074 5	Zg02-C ₇ H ₆	F, U, P
M4	5.96	[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₁₈ ClNO ₄	382.083 2	-3.7	137.987 6 244.097 4 338.094 4	Zg02-C ₇ H ₆ +CH ₂	F, U
M5	4.16	[M+H] ⁺	C ₂₆ H ₂₆ ClNO ₉	532.139 5	3.9	139.992 3 370.085 2 394.151 2	Zg02-C ₇ H ₆ +C ₆ H ₁₀ O ₅	U
M6	4.03	[M-H] ⁻	C ₂₆ H ₂₄ ClNO ₁₀	544.103 5	4.6	368.068 2 406.114 2	Zg02-C ₇ H ₆ +C ₆ H ₈ O ₆	U
M7	5.23	[M-H] ⁻	C ₂₀ H ₁₉ NO ₃	320.127 2	-4.7	230.081 5 276.138 2	Zg02-C ₇ H ₃ ClO	F, U, P
M8	5.42	[M-H] ⁻	C ₂₂ H ₂₁ NO ₄	362.138 0	-3.3	91.054 8 272.092 3	Zg02-C ₇ H ₃ ClO+C ₂ H ₂ O	F, U, P
M9	3.56	[M+H] ⁺	C ₂₆ H ₂₉ NO ₈	484.197 8	1.4	93.063 3 322.144 3 394.153 3	Zg02-C ₇ H ₃ ClO+C ₆ H ₁₀ O ₅	U
M10	5.28	[M-H] ⁻	C ₂₀ H ₂₁ NO ₃	322.145 2	2.8	91.054 4 232.097 2 278.154 9	Zg02-C ₇ H ₃ ClO+H ₂	F, U, P
M11	5.63	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₁₇ NO ₄	360.123 8	0.6	228.066 7 270.088 3 318.122 6	Zg02-C ₇ H ₃ ClO-2(H ₂)+C ₂ H ₂ O	F, P
M12	3.43	[M+H] ⁺	C ₂₈ H ₂₇ NO ₉	522.174 4	-3.8	228.065 2 270.087 5	Zg02-C ₇ H ₃ ClO-2(H ₂)+C ₂ H ₂ O +C ₆ H ₁₀ O ₅	F, U

**Figure 2** Mass spectrum of Zg02 in negative ion mode

2 Zg02 及代谢产物分析

原形化合物 Zg02 在负模式扫描条件下保留时间为 6.25 min, 在低能量扫描通道里存在 m/z 458.117 2 [M-H]⁻ 的准分子离子峰, 高能量通道可见碎片离子峰 m/z 186.092 3、323.073 0、414.126 6。

2.1 代谢产物 M1、M2、M3 及 M7 结构推测

M1 在负模式扫描条件下保留时间为 4.62 min, 在低能量扫描通道存在 m/z 622.182 5 [M+H]⁺ 的准分子离子峰, 高能量通道可见碎片离子峰 m/z 93.062 8、278.157 8、322.148 2、416.140 3。根据以上准分子离子及碎片离

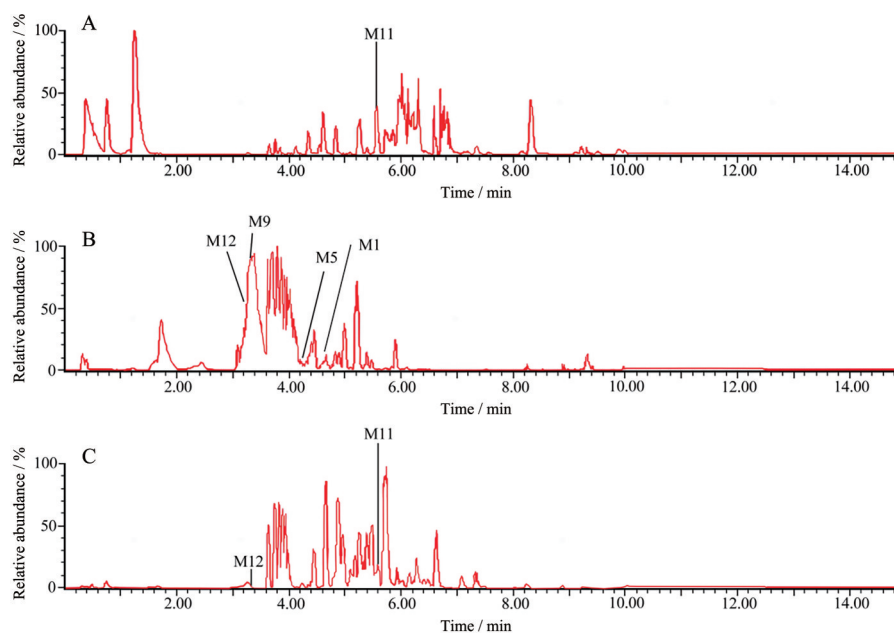


Figure 3 Base peak intensity (BPI) of plasma (A), urine (B), and fecal (C) samples scanned in positive ion mode. The names of M1–M12 were listed in Table 1

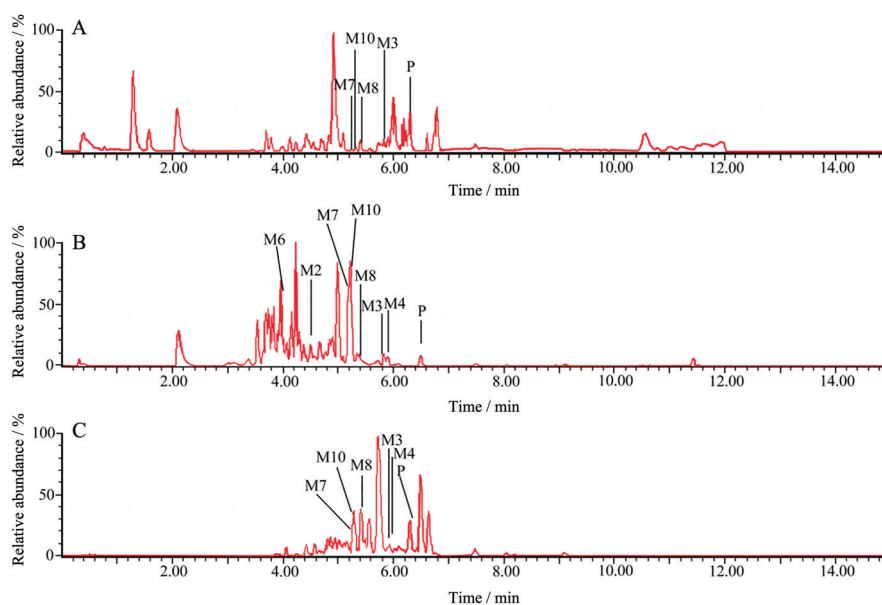


Figure 4 BPI of plasma (A), urine (B), and fecal (C) samples scanned in negative ion mode. The names of M1–M12 were listed in Table 1

子的结构,可推测 M1 由原型化合物直接转化,结构相当于 $Zg02+C_6H_{10}O_5$ 。

M2 在负模式扫描条件下保留时间为 4.52 min, 在低能量扫描通道存在 m/z 634.176 2 $[M-H]^-$ 的准分子离子峰, 高能量通道可见碎片离子峰 m/z 138.001 1、320.128 7、414.128 0、458.117 2。根据以上准分子离子及碎片离子的结构,可推测 M2 也由原型化合物直接转化,结构相当于 $Zg02+C_6H_8O_6$ 。

M3 在负模式扫描条件下保留时间为 5.82 min, 在

低能量扫描通道存在 m/z 368.070 5 $[M-H]^-$ 的准分子离子峰, 高能量通道可见碎片离子峰 m/z 137.988 3、230.081 7、324.074 5。根据以上准分子离子及碎片离子的结构,可推测 M3 也由原型化合物直接转化,结构相当于 $Zg02-C_7H_6$ 。

M7 在负模式扫描条件下保留时间为 5.23 min, 在低能量扫描通道存在 m/z 320.127 2 $[M-H]^-$ 的准分子离子峰, 高能量通道可见碎片离子峰 m/z 230.081 5、276.138 2。准分子离子峰 m/z 320.127 2 $[M-H]^-$ 推测

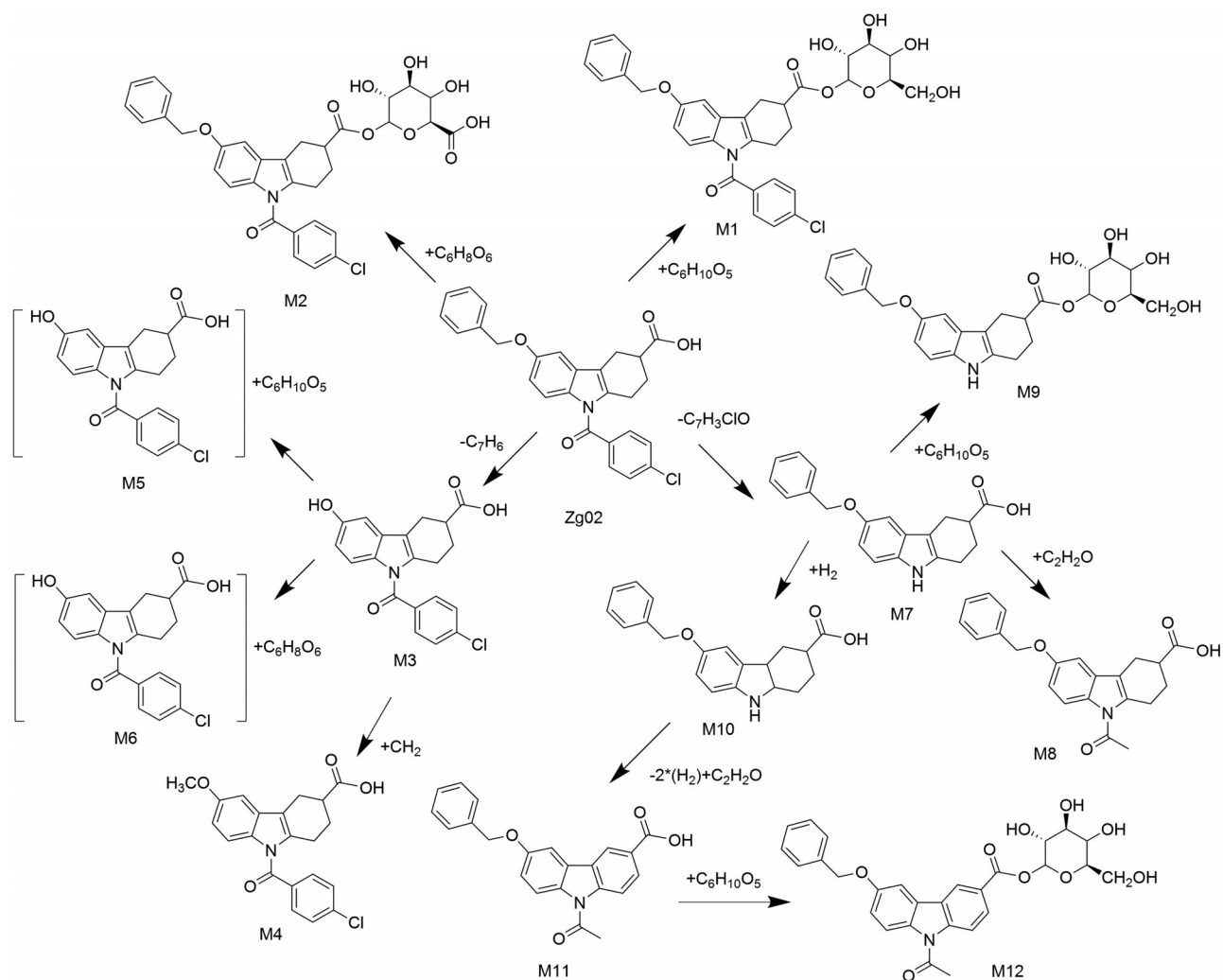


Figure 5 Metabolic pathways of Zg02 in rats

为 Zg02 结构中酰胺键断裂, 再结合其碎片离子的结构, 可推测出 M7 的结构为 Zg02-C₇H₃ClO。

2.2 代谢产物 M4、M5 及 M6 结构推测 M4 在负模式扫描条件下保留时间为 5.96 min, 在低能量扫描通道存在 m/z 382.083 2 [M-H]⁻ 的准分子离子峰, 高能量通道可见碎片离子峰 m/z 137.987 6、244.097 4、338.094 4。准分子离子峰 m/z 382.083 2 [M-H]⁻ 比 M3 多 14 Da 初步推测为: M3 (Zg02-C₇H₆)+CH₂。M3 结构中酚羟基或羧酸均容易发生甲基化的结合反应, 再根据以上准分子离子及碎片离子的结构, 可以推断 M4 是由 M3 的酚羟基甲基化后形成的。

M5 在负模式扫描条件下保留时间为 4.16 min, 在低能量扫描通道存在 m/z 532.139 5 [M+H]⁺ 的准分子离子峰, 高能量通道可见碎片离子峰 m/z 139.992 3、370.085 2、394.151 2。根据以上准分子离子及碎片离子的结构, 仅能初步推断 M5 的结构为 M3 (Zg02-C₇H₆)+C₆H₁₀O₅。

M6 在负模式扫描条件下保留时间为 4.03 min, 在低能量扫描通道存在 m/z 544.103 5 [M-H]⁻ 的准分子离子峰, 高能量通道可见碎片离子峰 m/z 368.068 2、406.114 2。碎片离子峰 m/z 368.068 2 [M-H]⁻ 推测为中性丢失葡萄糖醛酸 176 Da 的 M3, 再结合准分子离子和其余碎片离子的结构, 可推测 M6 的结构为 M3 (Zg02-C₇H₆)+C₆H₈O₆。

2.3 代谢产物 M8、M9、M10、M11 与 M12 结构推测 M8 在负模式扫描条件下保留时间为 5.42 min, 在低能量扫描通道存在 m/z 362.138 0 [M-H]⁻ 的准分子离子峰, 高能量通道可见碎片离子峰 m/z 91.054 8、272.092 3。根据以上准分子离子及碎片离子的结构, 可推测 M8 的结构为 M7 (Zg02-C₇H₃ClO)+C₂H₂O。

M9 在正模式扫描条件下保留时间为 3.56 min, 在低能量扫描通道存在 m/z 484.197 8 [M-H]⁻ 的准分子离子峰, 高能量通道可见碎片离子峰 m/z 93.063 3、322.144 3、394.153 3。根据以上准分子离子及碎片离

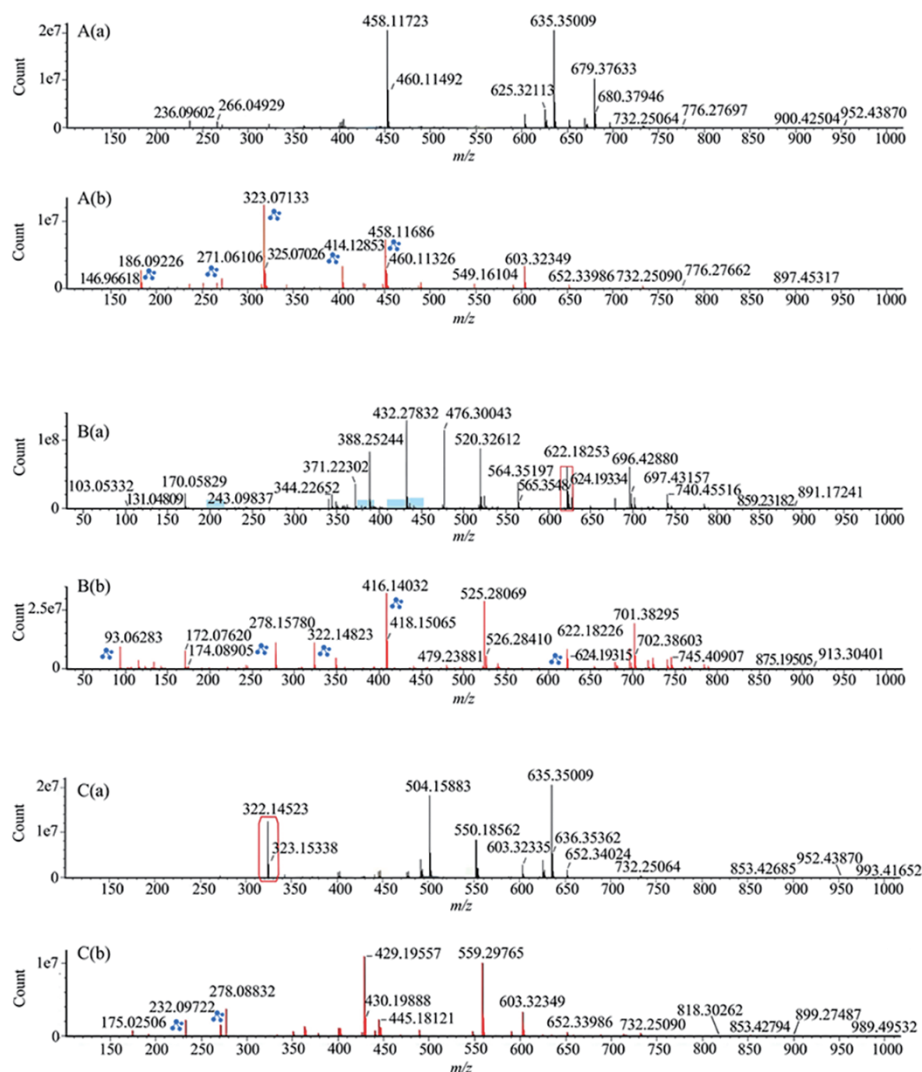


Figure 6 The mass spectrum with MS^E function at high collision energy (a) and low collision energy (b) of Zg02 (A), M5 (B) and M10 (C)

子的结构,可推测 M9 的结构为 M7 (Zg02-C₇H₃ClO)+C₆H₁₀O₅。

M10 在负模式扫描条件下保留时间为 5.28 min, 在低能量扫描通道存在 m/z 322.145 2 [M-H]⁻ 的准分子离子峰, 高能量通道可见碎片离子峰 m/z 91.054 4、232.097 2、278.154 9。根据以上准分子离子及碎片离子的结构,可推测 M10 的结构为 M7 (Zg02-C₇H₃ClO)+H₂。

M11 在正模式扫描条件下保留时间为 5.63 min, 在低能量扫描通道存在 m/z 360.123 8 [M+H]⁺ 的准分子离子峰, 高能量通道可见碎片离子峰 m/z 228.066 7、270.088 3、318.122 6。根据以上准分子离子及碎片离子的结构,可推测 M11 的结构为 M7 (Zg02-C₇H₃ClO)-2(H₂)+C₂H₂O。

M12 在正模式扫描条件下保留时间为 3.43 min, 在低能量扫描通道存在 m/z 522.174 4 [M+H]⁺ 的准分

子离子峰, 高能量通道可见碎片离子峰 m/z 228.065 2、270.087 5。准分子离子峰 m/z 522.174 4 [M+H]⁺ 比 M11 多 162 Da, 推测 M12 为 M11 葡萄糖基化后的代谢产物, 并且碎片离子峰 m/z 228.065 2、270.087 5 与 M11 中高能量通道的碎片离子峰的相似, 最终推测 M12 的结构为 M11 (Zg02-C₇H₃ClO)-2(H₂)+C₂H₂O+C₆H₁₀O₅。

讨论

使用 UPLC-Q/TOF 分析代谢产物的过程中, 根据不同结构的同位素峰的相对丰度的不同可推断未知化合物的结构, 特别是含天然核素 (Cl⁻ 和 Br⁻ 等) 的化合物容易通过同位素峰的丰度来判断。通常情况下含 Br 的化合物 M+2 峰的相对丰度与 M 峰的相对丰度一致, 含 Cl 的 M+2 峰的相对丰度是 M 峰的相对丰度的 1/3 (此处的 M 是分子离子, M+1 和 M+2 是核素离子)。分析 Zg02 及其代谢产物结构时, 能区别出离子中含 Cl

峰的 M+2 峰与不含 C1 峰的 M+1 (或 M+2) 峰, 增加了代谢产物推断的可靠性。

化合物结构在质谱检测时断裂规律的推断可以使用 ChemBioDraw 软件来辅助验证^[20]。

检测代谢产物的采集方式与流程: MS^E 采集方法可以在一个质谱周期内, 通过高、低碰撞能量全扫描, 从而简便、快速地获得组分的母离子及子离子信息, 但其高能量采集时是没有针对性的全扫描谱图的, 对同一出峰时间的所有物质均在高能量打碎, 造成了提供的碎片离子信息与单独 MS/MS 采集的会有所不同, 以 MS^E 采集方法得到的高能量图谱里面同一时间出峰的所有物质的碎片离子信息, 分析代谢产物时提升了推断代谢物碎片断裂信息的难度, 运用 Waters 公司开发的 UNIFI 软件可降低其分析难度, 该软件可以通过预先设定的原形化合物结构及原形化合物结构产生的碎片信息, 预测出代谢产物及产物断裂的碎片离子。所以初步推测受试化合物的代谢产物时, 可以采用 MS^E 采集方法结合相应分析软件快速地获得相关信息, 在进一步研究时, 通过预测的代谢物有针对性地进行 MS/MS 采集 (MS/MS 中轰击的能量可以参考 MS^E 采集得到的信息来调整)。通过代谢物的 MS/MS 信息来分析佐证前期 MS^E 全扫描时的推断。

由于 UPLC-Q-TOF/MS^E 检测的相关代谢产物并没有通过对照品 (购买标准品或合成出相应化合物) 进样确认, 或采取一定手段分离出代谢产物对其进行 UV、¹H NMR、¹³C NMR 检测以确证结构, 故对于单次灌胃给药 Zg02 后大鼠体内代谢产物的推断, 仅做了初步的分析推断。目前在开发候选化合物 Zg02 初期阶段, 后续可通过综合受试化合物其他研究的评价, 确定可以进一步深入开发该受试化合物后, 在具体确证其受试化合物的代谢产物, 代谢产物与原形化合物在体内含量的变化情况, 以期找出药效结构和毒副反应物质。

综上所述, 选用健康 SD 大鼠, 收集其血浆、粪便、尿液样品, 考察 Zg02 在大鼠体内代谢规律, 建立 UPLC-Q-TOF/MS^E 对生物样品血浆、尿液、粪便的高分辨质谱检测方法, 15 min 可完成对复杂生物样品的检测, 得到代谢产物的质谱数据。推断出 Zg02 单次灌胃给药 (20 mg·kg⁻¹) 后体内的 12 个代谢产物, 多数为 Zg02 原形结构和断裂结构后与葡萄糖醛酸化、葡萄糖基化结合反应, 同时对前期课题研究中体外肝微粒体代谢稳定性的结果相应^[19], 推测受试物 Zg02 的代谢主要为结合反应。

作者贡献: 张曼、程瑶完成数据收集、分析及文章撰写; 胡克荣协助完成动物实验; 陈瑞设计实验并提供学术指导;

黄静协助指导实验并审核文章。

利益冲突: 本文不存在任何利益冲突。

References

- [1] Wang Z, Cao Z, Yue Z, et al. Research progress of dihydro-myricetin in the treatment of diabetes mellitus [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023, 14: 1216907.
- [2] Taylor R, Al-Mrabeih A, Sattar N. Understanding the mechanisms of reversal of type 2 diabetes [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2019, 7: 726-736.
- [3] Ilonen J, Lempainen J, Veijola R. The heterogeneous pathogenesis of type 1 diabetes mellitus [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2019, 15: 635-650.
- [4] Saedi P, Petersohn I, Salpea P, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2019, 157: 107843.
- [5] Rooney MR, Fang M, Ogurtsova K, et al. Global prevalence of prediabetes [J]. *Diabetes Care*, 2023, 46: 1388-1394.
- [6] Anon. Diabetes mellitus and its prevention and treatment [J]. *Northwest Pharm J (西北药学杂志)*, 2020, 35: 980.
- [7] Chen L, Islam RM, Wang J, et al. A systematic review of trends in all-cause mortality among people with diabetes [J]. *Diabetologia*, 2020, 63: 1718-1735.
- [8] Su J, Luo Y, Hu S, et al. Advances in research on type 2 diabetes mellitus targets and therapeutic agents [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24: 13381.
- [9] Cousin E, Duncan BB, Stein C, et al. Diabetes mortality and trends before 25 years of age: an analysis of the Global Burden of Disease Study 2019 [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2022, 10: 177-192.
- [10] Feng L, Lu S, Zheng Z, et al. Identification of an allosteric hotspot for additive activation of PPAR γ in antidiabetic effects [J]. *Sci Bull*, 2021, 66: 1559-1570.
- [11] Johansson KS, Sonne DP, Knop FK, et al. What is on the horizon for type 2 diabetes pharmacotherapy? An overview of the antidiabetic drug development pipeline [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2020, 15: 1253-1265.
- [12] Sterrett JJ, Bragg S, Weart CW. Type 2 diabetes medication review [J]. *Am J Med Sci*, 2016, 351: 342-355.
- [13] Varghese S. Noninsulin diabetes medications [J]. *Nurs Clin North Am*, 2017, 52: 523-537.
- [14] Yang ZP, Li SM, Li YY, et al. Improvement on synthesis of novel hypoglycemic candidate Zg02 and chiral separation [J]. *Chem Reagents (化学试剂)*, 2017, 39: 1233-1236.
- [15] Wang LL, Du Y, Li SM, et al. Design, synthesis and evaluation of tetrahydrocarbazole derivatives as potential hypoglycemic agents [J]. *Bioorg Chem*, 2021, 115: 105172.
- [16] Zhang Y, Zhou B, Wen M, et al. Zg02 improved hepatic glucose

- metabolism and insulin sensitivity *via* activation of AMPK/Sirt1 signaling pathways in a high-fat diet/streptozotocin-induced type 2 diabetes model [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2020, 13: 4333-4339.
- [17] Zhang JQ, Hao Y, Chen R, et al. Study on the stability of hypoglycemic candidate 6-benzyloxy-9-(4-chlorobenzoyl)-tetrahydrocarbazole-3-carboxylic acid in artificial gastrointestinal fluid and catabolites analysis [J]. *China Pharm (中国药房)*, 2019, 30: 1177-1181.
- [18] Chen R, Zhang L, Cai J, et al. Study on metabolic stability of novel insulin sensitizer Zg02 in rat liver microsomes [J]. *China Pharm (中国药房)*, 2018, 29: 3359-3364.
- [19] Zhang JQ, Li SM, Ma X, et al. Discovery of tetrahydrocarbazoles with potent hypoglycemic and hypolipemic activities [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 150: 102-112.
- [20] Marissen R, Varunjikar MS, Laros JFJ, et al. CompareMS2 2.0: an improved software for comparing tandem mass spectrometry datasets [J]. *J Proteome Res*, 2022, 22: 514-519.