

一测多评法测定不同产地巴戟天中 4 种环烯醚萜含量

王丽丽¹, 崔庆艳², 张素中¹, 王永生², 王诗涵^{3*}¹中山大学新华学院 药学院, 广州 510520; ²吉林大学 药学院, 长春 130021; ³吉林农业大学 中药材学院, 长春 130118

摘要:建立同时测定不同产地巴戟天中 4 种环烯醚萜类成分(水晶兰苷、去乙酰基车叶草苷酸、车叶草苷酸和车叶草苷)的一测多评法。实验以去乙酰基车叶草苷酸为内参物, 基于 HPLC 法建立去乙酰基车叶草苷酸与其它成分的相对校正因子, 并用校正因子计算 4 种成分的含量; 使用外标法和一测多评法同时测定 11 批不同产地的巴戟天样品中这 4 种成分的含量, 结果表明外标法与一测多评法结果之间无明显差异, 说明了一测多评法的准确性和可行性。因此在缺乏对照品的情况下, 以去乙酰基车叶草苷酸为内参物同时测定水晶兰苷、车叶草苷酸和车叶草苷的含量是可行的。该方法可用于巴戟天的质量控制。

关键词:巴戟天; 一测多评; 相对校正因子; 去乙酰基车叶草苷酸

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)5-0784-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.5.010

Determination of four iridoids in *Morinda officinalis* How. from different producing areas by quantitative analysis of multi-components via single marker method

WANG Li-li¹, CUI Qing-yan², ZHANG Su-zhong¹, WANG Yong-sheng², WANG Shi-han^{3*}

¹School of Pharmacy, Xinhua College of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510520, China;

²School of Pharmacy, Jilin University, Changchun 130021, China;

³College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: In this study, a new strategy for quantitative analysis of multi-components using a single marker (QAMS) was developed for the determination of four iridoids (monotropein, deacetyl asperulosidic acid, asperulosidic acid, asperuloside) in *Morinda officinalis* How. from different producing areas. The relative correction factors (RCF) of deacetyl asperulosidic acid and other components were established by using deacetyl asperulosidic acid as the internal reference substance, and the content of the components was calculated by RCFs. The contents of these four components in 11 batches of *M. officinalis* from different areas were determined by external standard method and QAMS method. The results showed that there was no significant difference between the contents obtained by external standard method and QAMS method, indicating the accuracy and feasibility of the QAMS method. The QAMS method established in this study solved the problem of the availability and high cost of some standard substances, and would be useful for providing an efficient and feasible quality assessment method for *M. officinalis*.

Key words: *Morinda officinalis* How.; quantitative analysis of multi-components by single marker; relative correction factor; deacetyl asperulosidic acid

巴戟天来源于茜草科(Rubiaceae)植物巴戟天(*Morinda officinalis* How.)的干燥根^[1], 该中药材始载于《神农本草经》, 列为上品, 历代本草都有记载, 是著名的保健中药材, 也是我国“四大南药”之一, 以广东为道地产区, 具有抗骨质疏松、补肾阳、抗氧

化、抗肿瘤、抗炎、抗疲劳、增强机体免疫力等作用^[2,3]。巴戟天中主要成分有环烯醚萜类、萜醌类、糖类及有机酸类等^[3,4]。以水晶兰苷为代表的环烯醚萜类成分具有抗炎、镇痛、抗氧化、抗肿瘤、抗衰老、抗肥胖等作用^[4-8]。车叶草苷还具有骨保护和降低急性肺损伤的作用^[9]。

近年来, 随着人们的意识以医疗为重点转向以预防保健为重点, 巴戟天的需求量不断提升, 逐渐出现了以次充好的现象。《中国药典》2015年版巴戟

收稿日期: 2020-07-24

接受日期: 2021-01-25

基金项目: 广东省特色创新类项目(自然科学基金)(2018KTSCX317);

中山大学新华学院校级重点科研项目(2018ZD001)

* 通信作者 Tel: 86-015043005159; E-mail: wsh8805@163.com

天含量测定项选用耐斯糖一种成分作为定量指标^[1],存在一定的局限性,若能将多个指标性成分同时纳入定量指标,将对巴戟天的品质会有更全面的评估。

一测多评法是利用中药材有效成分之间的内在函数和比例关系,通过测定一种成分(对照品易于获得)而实现多种成分(对照品难以获得或价格昂贵)的同步测定,该方法是《中国药典》2015版重点推广的方法,现已成为中药材多指标成分含量测定的首选方法^[10]。但当前国内外尚无采用一测多评法测定其含量的报道。

本实验建立一测多评法,首次实现对巴戟天中4种环烯醚萜类成分水晶兰苷、去乙酰基车叶草苷酸、车叶草苷酸、车叶草苷的同步测定,并对不同产地巴戟天进行质量控制,为其质量标准修订提供参考。

1 仪器和试剂

Agilent 1260 型液相色谱仪(安捷伦公司);Wa-

ters Alliance E2695 型液相色谱仪(沃特世公司);LC-10ATVP 型岛津液相色谱仪(产地:日本);色谱柱:Venusil MP C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Agilent ZORBAX SB-Aq 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);Sartorius 型十万分之一天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);WP-UP-III-10 型超纯水机(四川沃特尔水处理设备有限公司)。

水晶兰苷(批号:5945-50-6,成都埃法生物科技有限公司);去乙酰基车叶草苷酸(批号:14259-55-3,成都埃法生物科技有限公司);车叶草苷酸(批号:25368-11-0,成都埃法生物科技有限公司);车叶草苷(批号:14259-45-1,成都埃法生物科技有限公司);11批巴戟天样品来源信息见表1,经吉林大学王广树教授鉴定,为茜草科(Rubiaceae)植物巴戟天(*Morinda officinalis* How.)的干燥根;乙腈为色谱纯(美国Fisher公司);水为超纯水(自制);其余试剂均为分析纯。

表1 11批巴戟天样品来源信息

Table 1 Eleven batches of *M. officinalis* source information

编号 No.	产地 Habitat	采集时间 Collection time
S1	广东高要	2017年10月
S2	广东德庆	2017年11月
S3	广东梅州	2017年11月
S4	广东郁南	2017年10月
S5	广西玉林	2017年11月
S6	广西岑溪	2017年11月
S7	广西钦州	2017年11月
S8	福建南靖	2017年11月
S9	福建龙岩	2017年11月
S10	海南琼中	2017年9月
S11	海南乐东	2017年9月

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Venusil MP C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为:乙腈(A)-0.2% 磷酸溶液 + 0.01 mol/L 磷酸氢二钾缓冲盐(B),梯度洗脱(0~12 min, 1% A; 12~30 min, 1% A → 17% A; 30~40 min, 17% A);流速为 1.0 mL/min;检测波长为 235 nm;柱温为 25 °C;进样量为 20 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备

精密称取水晶兰苷、去乙酰基车叶草苷酸、车叶

草苷酸和车叶草苷对照品适量,制成质量浓度分别为 2.540 0、0.840 0、5.025 0 × 10⁻²、2.028 0 × 10⁻² mg/mL 的混合对照品储备液。精密量取混合对照品储备液适量,制成质量浓度依次为 0.635 0、0.210 0、1.256 2 × 10⁻²、5.070 0 × 10⁻³ mg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备

称取巴戟天药材粉末 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入 80% 的甲醇,超声提取 30 min(功率为 400 W,频率为 90 Hz),过滤,滤渣再同法提取一次,合并提取液,水浴蒸干,用初始流动相溶解。过

滤,取续滤液,即得。

2.3 系统适用性试验

分别取“2.2”项下混合对照品溶液和供试品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样

测定,记录色谱图。结果,混合对照品溶液与供

试品溶液在相同时间处均有相应的色谱峰出现,各色谱峰分离较好,分离度均大于1.5;空白溶剂在相应保留时间处没有色谱峰出现,对测定无干扰;理论塔板数以所测目标成分计均大于8 000(见图1)。

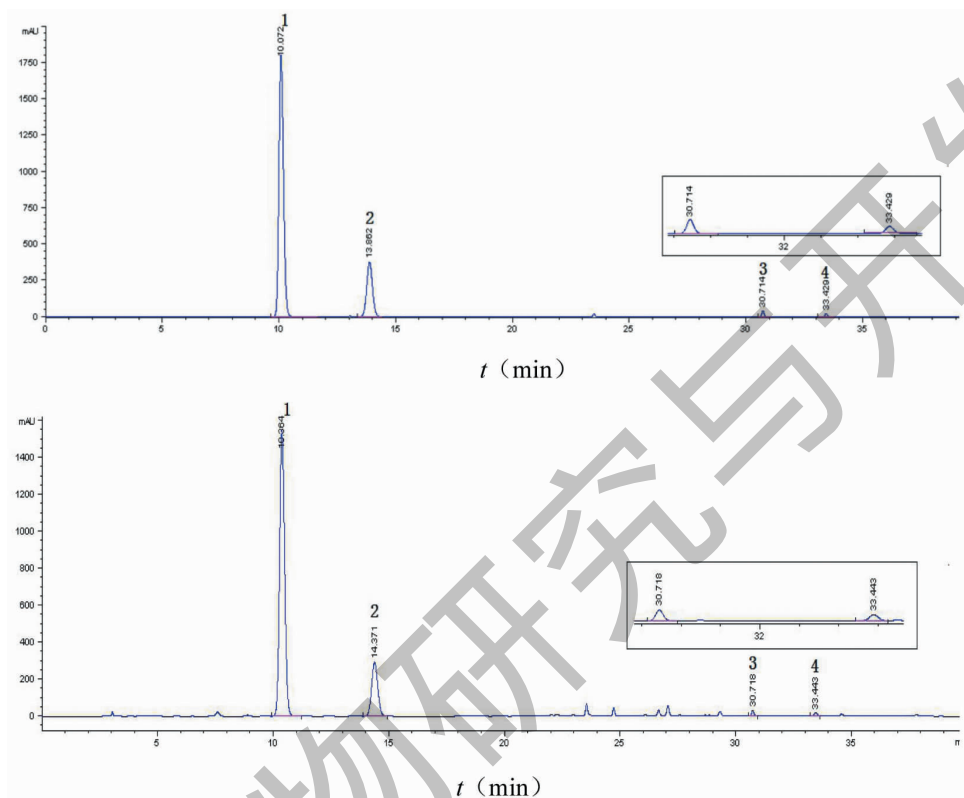


图1 混合对照品溶液(A)和样品(B)HPLC 图谱

Fig.1 HPLC of reference substances(A)and samples(B)

注:1:水晶兰苷;2:去乙酰基车叶草苷酸;3:车叶草苷酸;4:车叶草苷。Note:1:Monotropein;2:Deacetyl asperulosidic acid;3:Asperulosidic acid;4:Asperuloside.

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品储备液1.25、2.50、3.75、5.00、7.50 mL,置于20 mL量瓶中,加入初始流动相定容。按“2.1”项下色谱条件

进行测定,记录峰面积,以4种成分的质量浓度(X , $\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,进行线性回归,结果见表2。

表2 4种环烯醚萜成分的线性关系考察

Table 2 Investigation on the linear relationship of four kinds of iridoids

对照品 Component	回归方程 Regression equation	R^2	线性范围 Linearity($\mu\text{g}/\text{mL}$)
水晶兰苷 Monotropein	$Y = 1\ 834.1 X + 333.75$	0.999 6	317.500 0 ~ 1 905.000 0
去乙酰基车叶草苷酸 Deacetyl asperulosidic acid	$Y = 1\ 553.8 X + 17.108$	1.000 0	105.000 0 ~ 630.000 0
车叶草苷酸 Asperulosidic acid	$Y = 1\ 110 X + 1.378 4$	0.999 8	6.315 0 ~ 37.687 5
车叶草苷 Asperuloside	$Y = 1\ 584.8 X + 0.937 8$	0.999 8	2.535 0 ~ 15.210 0

2.5 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,水晶兰苷、去乙酰基车叶草苷酸、车叶草苷酸、车叶草苷峰面积的RSD分别为0.17%、0.08%、0.36%、0.47% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8、10、12、24 h,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,水晶兰苷、去乙酰基车叶草苷酸、车叶草苷酸、车叶草苷峰面积的RSD值分别为0.97%、0.43%、0.94%、1.31% ($n=6$),表明供试品溶液于室温下放置24 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取同一批巴戟天药材粉末,按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并按ESM法计算4种成分的含量。结果,水晶兰苷、去乙酰基车叶草苷酸、车叶草苷酸、车叶草苷的平均含量分别为12.02、3.85、0.12、0.08 mg/g, RSD分别为0.74%、0.80%、1.08%、1.34% ($n=6$),表明本方法重复性

良好。

2.8 加样回收率试验

取同一批巴戟天药材粉末6份,每份约0.25 g,精密称定,按样品含量-对照品约(1:1)的比例加入一定量对照品,按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果,水晶兰苷、去乙酰基车叶草苷酸、车叶草苷酸、车叶草苷的回收率分别为100.03%、99.97%、99.35%、99.68%, RSD分别为0.32%、1.05%、0.93%、1.01% ($n=6$),表明该方法的准确度较好。

2.9 相对校正因子的测定

取“2.2.1”项下混合对照品溶液5、10、15、20、30 μL ,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以去乙酰基车叶草苷酸(II)为内参物,根据公式按公式 $f_{k/m} = f_k/f_m = W_k \times A_m / (W_m \times A_k)^{[1]}$,式中 A_k 为内参物峰面积, W_k 为内参物的质量或浓度, A_m 为其他组分m的峰面积, W_m 为其他组分的质量或浓度。以去乙酰基车叶草苷酸(II)为内参物,分别计算水晶兰苷(I)、车叶草苷酸(III)、车叶草苷(IV)的相对校正因子(见表3)。

表3 巴戟天中3种环烯醚萜类成分相对校正因子
Table 3 Relative correction factors of three iridoids in *M. officinalis*

进样体积 Volume (μL)	相对校正因子 Relative correction factor		
	$f_{\text{I/II}}$	$f_{\text{III/II}}$	$f_{\text{IV/II}}$
5	1.429 3	1.276 0	1.324 5
10	1.425 6	1.289 7	1.323 3
15	1.423 6	1.269 2	1.324 4
20	1.418 7	1.263 8	1.318 1
30	1.394 8	1.263 8	1.315 2
平均值 Average	1.418 4	1.272 5	1.321 1
RSD (%)	0.97	0.85	0.32

2.9.1 不同仪器及色谱柱对相对校正因子的影响

考察三种不同型号仪器 Agilent 1260、Waters E2695、LC-10ATVP 液相色谱仪和两种不同色谱柱 Venusil MP C₁₈ 和 Agilent ZORBAX SB-Aq(均为250 mm \times 4.6 mm, 5 μm)对相对校正因子的影响,分别计算各成分的相对校正因子及RSD值。结果表明,使用不同仪器和色谱柱,各成分相对校正因子的RSD值均小于2.00%(见表4)。

2.9.2 不同实验人员对相对校正因子的影响

考察了3名实验人员对各成分相对校正因子的

影响,各成分相对校正因子的RSD值均小于2.00%(见表5)。

2.9.3 待测成分色谱峰的定位

采用相对保留时间定位法,考察其在3个高效液相色谱仪、2个不同色谱柱上各待测组分色谱峰的相对保留时间(t)和重现性。结果表明,在相同的色谱条件下,各成分相对保留时间在不同仪器和色谱柱条件下变化较小,RSD值均小于4.00%(见表6)。

表4 不同仪器和色谱柱对相对校正因子的影响

Table 4 Effect of different instruments and columns on relative correction factors

仪器 Instrument	色谱柱 Chromatographic column	相对校正因子 Relative correction factor		
		$f_{I/II}$	$f_{III/II}$	$f_{IV/II}$
Agilent 1260we	Venusil MP C ₁₈	1.418 4	1.272 5	1.321 1
	Agilent ZORBAX SB-Aq	1.398 8	1.245 9	1.331 4
Waters Alliance E2695	Venusil MP C ₁₈	1.421 4	1.263 8	1.324 8
	Agilent ZORBAX SB-Aq	1.391 7	1.255 7	1.316 0
岛津 LC-10ATVP	Venusil MP C ₁₈	1.412 6	1.271 2	1.320 3
	Agilent ZORBAX SB-Aq	1.429 9	1.283 1	1.336 8
平均值 Average		1.412 1	1.265 4	1.325 1
RSD(%)		1.02	1.04	0.58

表5 不同实验人员对相对校正因子的影响

Table 5 Effect of different experimenter on relative correction factors

人员 Personnel	相对校正因子 Relative correction factor		
	$f_{I/II}$	$f_{III/II}$	$f_{IV/II}$
实验员 1 Experimenter 1	1.418 4	1.272 5	1.321 1
实验员 2 Experimenter 2	1.428 7	1.306 9	1.353 1
实验员 3 Experimenter 3	1.439 2	1.310 7	1.341 2
平均值 Average	1.428 7	1.296 7	1.338 5
RSD(%)	0.73	1.62	1.21

表6 不同仪器和色谱柱对相对保留时间的影响

Table 6 Effects of different instruments and columns on relative retention time

仪器 Instrument	色谱柱 Chromatographic column	相对保留时间 Relative retention time		
		$t_{I/II}$	$t_{III/II}$	$t_{IV/II}$
Agilent 1260	Venusil MP C ₁₈	0.727 7	2.237 0	2.433 8
	Agilent ZORBAX SB-Aq	0.726 1	2.316 2	2.479 9
Waters Alliance E2695	Venusil MP C ₁₈	0.748 3	2.165 4	2.292 6
	Agilent ZORBAX SB-Aq	0.714 4	2.153 1	2.337 0
LC-10ATVP 岛津	Venusil MP C ₁₈	0.731 2	2.296 0	2.376 6
	Agilent ZORBAX SB-Aq	0.711 0	2.305 0	2.453 1
平均值 Average		0.726 5	2.245 5	2.395 5
RSD(%)		1.83	3.22	3.03

2.10 样品含量测定

取 11 批不同产地巴戟天样品,按“2.2.2”项下方法制备巴戟天样品溶液,每个产地的药材平行制备 2 份样品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,分别用外标法(ESM)和一测多评法

(QAMS)计算各成分的含量,并将两种方法的含量测定结果进行比较,结果显示相对标准偏差(RSD)均小于 2.00%,表明外标法与一测多评法测定结果之间无明显差异,说明本实验所建立的同时测定巴戟天中 4 种成分的一测多评法准确性良好(见表 7)。

表7 不同产地巴戟天4种环烯醚萜测定结果

Table 7 Determination of four iridoids in *M. officinalis* in different areas

编号 No.	产地 Habitat	去乙酰基 车叶草苷酸 Deacetyl asperulosidic acid (mg/g)		水晶兰苷 Monotropein (mg/g)		车叶草苷酸 Asperulosidic acid (mg/g)			车叶草苷 Asperuloside (mg/g)		
		ESM	ESM	QAMS	RSD(%)	ESM	QAMS	RSD(%)	ESM	QAMS	RSD(%)
S1	广东高要	5.359	15.720	15.632	0.40	0.173	0.171	0.82	0.094	0.092	1.52
S2	广东德庆	4.930	11.349	11.285	0.40	0.106	0.107	0.66	0.038	0.037	1.89
S3	广东梅州	3.977	12.277	12.208	0.40	0.126	0.124	1.13	0.082	0.081	0.87
S4	广东郁南	6.675	12.226	12.158	0.39	0.162	0.161	0.44	0.154	0.151	1.39
S5	广西玉林	5.799	10.893	10.832	0.40	0.086	0.085	0.83	0.012	0.012	0.00
S6	广西岑溪	6.860	11.778	11.712	0.40	0.122	0.121	0.58	0.013	0.013	0.00
S7	广西钦州	5.245	11.907	11.840	0.40	0.116	0.115	0.61	0.021	0.021	0.00
S8	福建南靖	3.135	13.561	13.485	0.40	0.090	0.089	0.79	0.021	0.021	0.00
S9	福建龙岩	4.705	8.215	8.169	0.40	0.033	0.033	0.00	0.000	0.000	-
S10	海南琼中	4.180	6.389	6.354	0.39	0.027	0.027	0.00	0.014	0.014	0.00
S11	海南乐东	4.964	17.203	17.106	0.40	0.144	0.142	0.99	0.112	0.110	1.27

3 讨论

本实验考察了提取溶剂(70%、80%、90% 甲醇)、不同提取方法(超声提取法、加热回流提取法)以及不同提取时间(20、30、40 min),综合考虑各种因素,如提取方法的易操作性、运行成本、待测成分的提取率,最终确定巴戟天供试品溶液的制备方法以80% 甲醇为提取溶剂、超声提取2次、每次提取时间为30 min。

本实验分别采用甲醇-磷酸水和乙腈-磷酸水作为流动相,发现以乙腈-磷酸水作为流动相时,各待测成分峰形及分离度较好,理论塔板数也较高,最终确定了流动相:乙腈(A)~0.2% 磷酸溶液+0.01 mol/L 磷酸氢二钾缓冲盐(B),梯度洗脱(0~12 min,1% A;12~30 min,1% A→17% A;30~40 min,17% A)。

因去乙酰基车叶草苷酸对照品价格便宜、容易获得、性质稳定,故本实验将去乙酰基车叶草苷酸为内参物进行一测多评分析。

本实验建立的 QAMS 法,首次实现对巴戟天中4种环烯醚萜类成分水晶兰苷、去乙酰基车叶草苷酸、车叶草苷酸、车叶草苷的同时测定。通过方法学考察、相对校正因子耐用性实验以及 QAMS 法计算值与 ESM 法实测值 RSD 值的比较,表明本文所建立的方法操作便捷、结果准确、重复性好。解决了传

统多指标成分评价模式对照品使用量大,检测成本高,部分对照品不易获得等不足。可为全面评价巴戟天的质量提供参考依据。

不同产地巴戟天各成分含量存在差异,其中以水晶兰苷的含量差异较为明显,其中第9批和第10批的水晶兰苷含量较低,其原因可能与巴戟天来源于不同产地有关。

综上所述,本实验建立的 QAMS 法,方法准确、可靠,重复性好,可为巴戟天的质量控制提供新的方法。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015:255.
- 2 Wang YF, Li YH, Xing ZQ, et al. Review of experiment research progress in treating deficiency of kidney-yang syndrome by *Morinda officinalis* How. and its effective components [J]. Chin J Tradit Chin Med (中华中医药杂志), 2016, 31:5165-5167.
- 3 Zhan J, Xu DP. Anti-fatigue constituents of *Morinda officinalis* How. [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2019, 31:995-1000.
- 4 Su XM, Wang HQ, Chen RY, et al. Research progress on

- chemical constituents and pharmacological activities of *Morinda officinalis*[J]. J Chin Mater Med(中药材), 2017, 40:986-991.
- 5 Zhang JH, Xu YM, He YQ, et al. Studies on content determination and extraction method of iridoid glycosides in *Morinda officinalis* How. [J]. J Pharm Pract(药学实践杂志), 2017, 35:328-333.
 - 6 Hong Q, Xu ML, Tang J. Advances of study on the iridoid asperuloside[J]. Chin Wild Plant Res(中国野生植物资源), 2018, 37(4):43-45.
 - 7 Tang J, Hong Q, Chen J, et al. Application of trifoside in preparation of drugs for prevention and treatment of neurodegenerative diseases(车叶草苷在制备防治神经退行性疾病药物中的应用):CN106902128A. 2017-06-30.
 - 8 Liao TS, Min JX, Pan LL, et al. Research progress on iridoid compounds in plants from Rubiaceae[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2018, 49:1437-1450.
 - 9 Qiu JM, Chi GF, Wu QC, et al. Pretreatment with the compound asperuloside decreases acute lung injury via inhibiting MAPK and NF- κ B signaling in a murine model[J]. Int. Immunopharmacol(国际免疫药理学), 2016, 31(2):109-115.
 - 10 Qin KM, Yang B, Hu J, et al. Application status and thinking of quantitative analysis of multi-components by single marker in quality control of multi-components traditional Chinese medicine[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2018, 49:725-731.
 - 11 Huang QL, Luo L, Li Q, et al. Study on applicability of QAMS to *Phellodendri chinensis* cortex formula granules and cork-pieces[J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2015, 35:1470-1474.
-
- (上接第 749 页)
- 19 Bow DAJ, Perry JL, Miller DS, et al. Localization of P-gp (Abcb1) and Mrp2 (Abcc2) in freshly isolated rat hepatocytes[J]. Drug Meta Dispos, 2008, 36:198-202.
 - 20 Raftogianis RB, Wood TC, Weinshilboum RM. Human phenol sulfotransferases SULT1A2 and SULT1A1: genetic polymorphisms, allozyme properties, and human liver genotype-phenotype correlations[J]. Biochem Pharmacol, 1999, 58:605-616.
 - 21 Qi YY. Expression and significance of UGT1A and its related factors of the signal transduction pathway incolonic adenoma and colon adenocarcinoma[D]. Jinan: Shandong University(山东大学), 2012.
 - 22 Chen Q, Xu Z, Sun H, et al. Advances on biological characteristics of PXR and its effect on drug metabolism[J]. Chin J Clin Pharm Therap(中国临床药理学与治疗学), 2013, 18:241-246.
 - 23 Tang H, Xu M, Shi F, et al. Effects and mechanism of nano-copper exposure on hepatic cytochrome P450 enzymes in rats [J]. Int J Molr Sci, 2018, 19:2140-2156.