

• 药剂与工艺 •

Box-Behnken 设计-效应面法优化延胡索乙素聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒处方和体外释药行为研究尹元元¹, 耿燕娜¹, 范明松^{2*}

1. 河南大学淮河医院, 河南 开封 475000

2. 上海雷允上药业有限公司技术中心, 上海 201401

摘要:目的 Box-Behnken 设计-效应面法(Box-Behnken design-response surface method, BBD-RSM)优化延胡索乙素(THP)聚乳酸-羟基乙酸共聚物[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA]纳米粒(THP-PLGA-NPs)处方,并进行体外评价。方法 纳米沉淀法制备 THP-PLGA-NPs,以包封率、载药量、多分散系数(polydispersity index, PDI)和粒径大小为评价指标,单因素结合 BBD-RSM 筛选最优处方,采用甘露醇作为冻干保护剂制备成冻干粉,将最优处方进行表征及体外释放实验。结果 最佳处方为 PLGA 用量为 491.8 mg、油水体积比 1:5.2、乳化剂质量分数为 1.12%。THP-PLGA-NPS 包封率为(185.07±1.06)%,载药量为(4.73±0.21)%,粒径为(181.32±7.14)nm,分别与模型预测值接近。体外释药具有明显的缓释特征,释药过程符合 Higuchi 模型: $M_t/M_\infty=0.1124t^{1/2}+0.0780$, $r=0.9879$ 。结论 Box-Behnken 实验设计可用于 THP-PLGA-NPS 处方的筛选,且优化后的纳米粒具有缓释作用。

关键词: 延胡索乙素; PLGA 纳米粒; 纳米沉淀法; 处方优化; Box-Behnken 设计-效应面法; 缓释特征; 体外释放

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)22-6806-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.22.005

Formulation optimization of THP-PLGA nanoparticles by Box-Behnken design-response surface method and *in vitro* release studyYIN Yuan-yuan¹, GENG Yan-na¹, FAN Ming-song²

1. Huaihe Hospital of Henan University, Kaifeng 475000, China

2. Technique Center, Shanghai Leiyunshang Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai 201401, China

Abstract: Objective To optimize the formulation of tetrahydropalmatine (THP) poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles (THP-PLGA-NPs) by Box-Behnken design-response surface method (BBD-RSM), and carry out *in vitro* evaluation. **Methods** Nanoprecipitation method was used to prepare THP-PLGA-NPs. Encapsulation efficiency, drug loading, polydispersity index (PDI) and particle size were used as evaluation index, single factor investigation method combined with BBD-RSM to investigate the optimal prescriptions of THP-PLGA-NPs. THP-PLGA-NPs were prepared into lyophilized powder using mannitol as freeze-dried protectors. The optimal formulation was characterized and *in vitro* release experiments were also carried out. **Results** The optimal formulation: PLGA dosage was 491.8 mg, oil-water volume ratio was 1:5.2 and surfactant concentration was 1.12%. Envelopment efficiency, drug loading and particle size of THP-PLGA-NPS were (185.07±1.06)%, (4.73±0.21)% and (181.32±7.14) nm, respectively. The results were close to that of predicted values. The drug release *in vitro* had obvious sustained-release characteristics, and the release process conformed to the Higuchi model: $M_t/M_\infty=0.1124t^{1/2}+0.0780$, $r=0.9879$. **Conclusion** It is feasible to apply BBD-RSM for the formulation optimization of THP-PLGA-NPS, and the optimized PLGA nanoparticles have slow-release effects.

Key words: tetrahydropalmatine; PLGA nanoparticles; nanoprecipitation method; prescription optimization; Box-Behnken design-response surface method; sustained-release characteristics; *in vitro* release

收稿日期: 2021-05-14

基金项目: 国家重大新药创制(2018ZX09210090-002-009); 上海市科委项目(21S21903400)

作者简介: 尹元元(1988—),女,硕士,从事中药学研究。Tel: (0371)23906791 E-mail: yinyuan1102@126.com

*通信作者: 范明松(1973—),男,博士,从事药物研发工作。Tel: (021)51583466 E-mail: msfan007@163.com

延胡索乙素 (tetrahydropalmatine, THP) 是一种异喹啉类生物碱, 主要从罂粟科紫堇属植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 提取得到^[1]。研究发现, THP 具有抗肿瘤、降血压、抗心律失常、镇痛、神经保护、抗焦虑等多种药理活性^[2-4]。但 THP 体内稳定差^[5], 不易溶于水^[6], 体外溶出受限, 生物利用度低^[5]。而且 THP 具有一定的急性毒性^[7], 安全性存在一定隐患, 故传统制剂不利于 THP 发挥药效, 在临床上的应用受到较大限制。

纳米给药系统可改善难溶性药物的溶解度和溶出度, 提高药物的生物利用度, 提高靶向性及药效, 降低毒副作用等, 因而在医药研发领域颇受专家学者关注^[8]。聚乳酸-羟基乙酸共聚物 [poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA] 是一种安全、无毒且可生物降解的纳米载体, 最终产物是二氧化碳和水^[9-10], 已被美国 FDA 批准用于临床研究, 国内外研究者采用 PLGA 制备纳米粒的研究越来越多^[11-14], 有效提高了生物利用度及药效。Box-Behnken 设计-响应面法 (Box-Behnken design-response surface method, BBD-RSM) 是常用的处方优化方法, 具有精确度高、预测性强等特点^[15-16]。

因此, 本研究采用 BBD-RSM 对 THP-PLGA 纳米粒 (THP-PLGA-NPs) 处方进行研究, 在单因素考察的基础上, 选择 PLGA 用量、油水体积比和乳化剂质量分数分别作为自变量, 选择包封率、载药量和粒径大小分别作为因变量, 期望得到具有理想包封率、载药量和粒径的 THP-PLGA-NPs 处方。进一步制备成冻干粉, 考察稳定性及体外释药情况, 期望通过本研究为 THP 纳米制剂研发提供参考, 也为后续体内药动学、药效学等评价奠定基础。

1 仪器与材料

1260 型高效液相色谱仪 (HPLC), 配置 DAD 检测器, Agilent 公司; QUINTIX125D-1CN 型电子天平, 赛多利斯仪器公司; ZNCL-S-5D 型多点数显磁力搅拌器, 上海越众仪器设备有限公司; RC-6D 型溶出仪, 天津创兴电子设备制造股份有限公司; DW-86L388J 型超低温冰箱, 深圳市科力易翔仪器设备有限公司; 12V20AH 型超声仪, 苏州东风亚森新能源科技有限公司; Master-sizer 型粒度分析仪, 马尔文仪器公司; JSM-IT500 型扫描电子显微镜 (SEM), 日本电子株式会社; CTFD-12P 型真空冻干机, 深圳市科力易翔仪器设备有限公司; GXF-03A 型气动安瓿轧盖机, 广州冠鑫轻工机械制造有

限公司。

THP 对照品, 批号 110726-202020, 质量分数 99.3%, 中国食品药品检定研究院; THP 原料药, 批号 200216, 质量分数 98%, 成都嘉叶生物科技有限公司; 聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA), 75:25, 相对分子质量为 15 000~20 000, 德国 Evonik Industries 公司; 甘露醇 (批号 20191105)、蔗糖 (批号 20200302)、乳糖 (批号 20190915), 上海康朗生物科技有限公司; 泊洛沙姆 188, 批号 WPEE587E, 德国巴斯夫有限公司; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Thermo-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 柱; 流动相为甲醇-0.1%乙酸水溶液 (稀三乙胺调 pH 值至 5.8 左右) (60:40); 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 35 °C; 检测波长为 281 nm; 进样体积为 10 μL。THP 在 8.2 min 左右出峰, 理论塔板数以 THP 计不低于 8500, 色谱图见图 1。

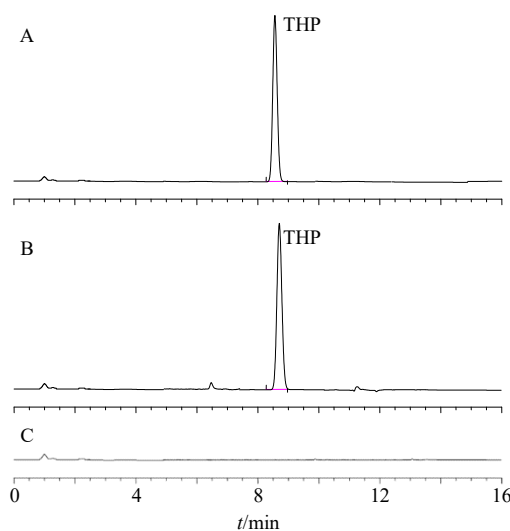


图 1 THP 对照品 (A) 和 THP-PLGA-NPs 样品 (B)、空白 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC spectrum of THP reference substance (A), THP-PLGA-NPs sample (B) and blank (C)

2.1.2 供试品溶液的配制 精密量取 1 mL 的 THP-PLGA-NPs 混悬液至 50 mL 量瓶中, 加入 10 mL 丙酮, 超声 5 min 以破坏 THP-PLGA-NPs, 放置至室温, 甲醇定容至刻度线, 即得 THP-PLGA-NPs 供试品溶液。空白 PLGA 纳米粒供试品溶液同法制备。

2.1.3 对照品储备液的配制及线性关系考察 精密称取 THP 对照品 10 mg 溶于 100 mL 甲醇, 得质量浓度为 100 μg/mL 的 THP 对照品储备液。流动相作

为稀释液,分别配制质量浓度为 20.00、10.00、5.00、0.50、0.10、0.05 $\mu\text{g/mL}$ 的 THP 对照品溶液,分别进样,测定各个质量浓度的峰面积。以 THP 质量浓度为横坐标 (X),峰面积为纵坐标 (Y),得线性回归方程 $Y=18.157\ 4\ X-0.523\ 8$, $r=0.999\ 9$,因此 THP 在 0.05~20.00 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.1.4 精密度试验 取质量浓度为 0.05、5.00、20.00 $\mu\text{g/mL}$ 的 THP 对照品溶液,分别进 HPLC 测定 6 次,计算得 THP 峰面积的 RSD 值分别为 0.56%、0.34%、0.32%,可见仪器精密度良好。

2.1.5 稳定性试验 取 THP-PLGA-NPs 供试品溶液,于 0、3、6、9、12、24 h 进样测定 THP,计算得 THP 峰面积的 RSD 值为 0.73%,所以供试品溶液在 24 h 稳定性良好。

2.1.6 重复性试验 取 THP-PLGA-NPs 混悬液,按照“2.1.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,进样测定 THP,计算得 THP 质量浓度的 RSD 值为 1.63%,所以重复性良好。

2.1.7 加样回收率试验 取 9 份 0.5 mL 的 THP-PLGA-NPs 混悬液,分为 3 组,每组各 3 份,分别加入 100 $\mu\text{g/mL}$ THP 对照品贮备液 1.5、3.0、4.5 mL。按照“2.1.2”项下方法操作,分别制备 THP-PLGA-NPs 供试品溶液,进样测定,计算 THP 含量及回收率。结果显示,THP 的平均加样回收率为 100.26%,RSD 为 1.84%,可见回收率较高。

2.2 THP-PLGA-NPs 的制备^[11]

沉淀法制备 THP-PLGA-NPs。取 30 mg 的 THP 和适量的 PLGA 溶于 20 mL 有机溶剂中,超声溶解得有机相。配制一定体积、一定浓度的稳定剂水溶液作为水相。将有机相用注射器逐滴滴加至水相中,滴毕后于一定功率下超声(工作 2 s,间隔 1 s)。减压旋蒸除尽有机溶剂,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得 THP-PLGA-NPs 混悬液。

空白 PLGA-NPs 除不加 THP 外同法制备。

2.3 包封率、载药量、粒径及 Zeta 电位的测定

取 1 mL 的 THP-PLGA-NPs 混悬液至离心管

中,于温度为 4 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下 12 000 r/min 高速离心 30 min,取续滤液测定游离 THP 质量浓度,计算含量 ($m_{\text{游离}}$)。精密量 1 mL THP-PLGA-NPs 至 50 mL 量瓶,加入 10 mL 丙酮,超声 5 min 破坏 THP-PLGA-NPs,放置至室温,甲醇定容至刻度线,进样测定 THP 质量浓度,计算 THP 总含量 ($m_{\text{总}}$)。取 1 mL 的 THP-PLGA-NPs 混悬液于 -60 $^{\circ}\text{C}$ 预冻 2 d 后低温冻干,称质量 (m_0)。按下式计算 THP-PLGA-NPs 的包封率和载药量。

$$\text{包封率} = (m_{\text{总}} - m_{\text{游离}}) / m_{\text{总}}$$

$$\text{载药量} = (m_{\text{总}} - m_{\text{游离}}) / m_0$$

取 THP-PLGA-NPs 混悬液 0.1 mL,加入蒸馏水 4 mL 混匀,取适量置于比色皿中,于粒度分析仪上测定 THP-PLGA-NPs 的粒径、PDI 和 Zeta 电位。

2.4 THP-PLGA-NPs 单因素考察

2.4.1 有机溶剂种类的考察 固定 THP 用量为 30 mg, PLGA 用量为 500 mg,泊洛沙姆 188 质量分数为 0.8%,油水体积比为 1:5,超声功率为 250 W,超声时间为 10 min,减压旋蒸为 3 h 的条件下,分别考察丙酮、二氯甲烷和两者等量混合溶剂作为有机溶剂时对 THP-PLGA-NPs 包封率、载药量、粒径、PDI 和 Zeta 电位的影响,结果见表 1。不同溶剂对 THP-PLGA-NPs 包封率、载药量和粒径等有一定的影响,二氯甲烷的包封率和载药量高于丙酮,可能是由于二氯甲烷脱除速率较快,降低了药物进入水相几率,有利于 PLGA 材料包裹药物。而采用丙酮和二氯甲烷混合溶剂制备的 THP-PLGA-NPs 包封率和载药量相对更高,且粒径、PDI 相对较小,Zeta 电位绝对值相对较大,故选择丙酮和二氯甲烷等量混合溶剂来制备 THP-PLGA-NPs。

2.4.2 PLGA 用量的考察 固定 THP 用量为 30 mg,有机溶剂为丙酮和二氯甲烷等量混合溶剂,泊洛沙姆 188 质量分数为 0.8%,油水体积比为 1:5,超声功率为 250 W,超声时间为 10 min,减压旋蒸为 3 h 的条件下,考察 PLGA 用量为 400、450、500、550 mg 时对 THP-PLGA-NPs 包封率、载药量、粒

表 1 有机溶剂种类的考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Investigation of organic solvents ($\bar{x} \pm s, n=3$)

有机溶剂种类	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
丙酮	58.14 \pm 2.07	3.12 \pm 0.23	211.07 \pm 8.31	0.218 \pm 0.19	-25.63 \pm 1.24
二氯甲烷	65.07 \pm 1.81	3.64 \pm 0.15	193.64 \pm 7.06	0.245 \pm 0.24	-21.16 \pm 1.08
丙酮-二氯甲烷 (1:1)	71.85 \pm 1.43	3.90 \pm 0.19	175.12 \pm 6.82	0.146 \pm 0.17	-28.63 \pm 1.53

径、PDI 和 Zeta 电位的影响,结果见表 2。随着 PLGA 用量的增加 THP-PLGA-NPs 粒径呈增大趋势,可能是由于 PLGA 用量的增加提高了体系的黏度所致。随着 PLGA 用量的增加,包封率总体呈增加趋势,

但增加到一定程度后载药量下降明显。当 PLGA 用量为 500 mg 左右时 THP-PLGA-NPs 的各个指标均较好,但需要进行进一步优化。

2.4.3 油水体积比的考察 固定 THP 用量为 30 mg,

表 2 PLGA 用量的考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Investigation of PLGA dosage ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

PLGA 用量/mg	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
400	56.08±1.92	3.63±0.14	158.72±6.04	0.160±0.22	-28.04±1.27
450	64.92±2.03	3.81±0.21	166.15±6.92	0.175±0.20	-31.81±1.33
500	72.46±1.74	3.91±0.23	178.93±8.02	0.169±0.17	-30.29±1.67
550	70.01±1.85	3.41±0.16	189.25±7.48	0.148±0.19	-29.72±1.73

PLGA 用量为 500 mg,有机溶剂为丙酮和二氯甲烷等量混合溶剂,泊洛沙姆 188 质量分数为 0.8%,超声功率为 250 W,超声时间为 10 min,减压旋蒸为 3 h 的条件下,分别考察油水体积比为 1:3、1:4、1:5、1:6 时对 THP-PLGA-NPs 包封率、载药量、粒径、PDI 和 Zeta 电位的影响,结果见表 3。随着水相体积的增加,HP-PLGA 纳米粒的粒径和 PDI 值呈减小趋势。包封率和载药量先增大后减小,可能是随着水相体积的增大,在乳化剂增溶作用下使药物进入水相,影响了 PLGA 材料对药物的包裹。综合考虑,选择油水体积比为 1:5 左右继续进行后续优化。

2.4.4 乳化剂质量分数的考察 固定 THP 用量为 30 mg,PLGA 用量为 500 mg,有机溶剂为丙酮和二氯甲烷等量混合溶剂,油水体积比为 1:5,超声

功率为 250 W,超声时间为 10 min,减压旋蒸为 3 h 的条件下,分别考察乳化剂质量分数对 THP-PLGA-NPs 包封率、载药量、粒径、PDI 和 Zeta 电位的影响,结果见表 4。随着乳化剂质量分数的增加,包封率和载药量均呈先增加后减少趋势,而粒径呈现变小后增大。这可能是当乳化剂质量分数不足时影响乳化效果,导致 PDI 值较高,且 Zeta 电位绝对值也较低,但质量分数过高时则使药物进入水相,影响 PLGA 材料的包裹。随着乳化剂质量分数的增加,油水界面张力下降,故形成纳米粒粒径较小,当进一步增加乳化剂质量分数时体系的黏度也随之上升,使形成纳米粒的粒径反而变大,PDI 值也有变大趋势。综合考虑,需选择乳化剂质量分数为 1.0%左右继续进行处方优化。

2.4.5 超声时间的影响 固定 THP 用量为 30 mg,

表 3 油水体积比的考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Investigation of volume ratio of oil to water ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

油水体积比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
1:3	69.91±1.35	3.94±0.21	223.42±8.19	0.253±0.30	-27.46±1.35
1:4	73.15±1.94	3.87±0.13	197.92±5.04	0.186±0.22	-32.83±1.67
1:5	73.01±1.82	3.99±0.22	173.69±3.23	0.173±0.14	-31.17±1.08
1:6	67.63±2.07	3.72±0.17	170.28±6.97	0.152±0.17	-33.42±1.86

表 4 乳化剂质量分数的考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Investigation of concentration of surfactant ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

乳化剂质量分数/%	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
0.5	60.04±1.71	3.35±0.09	206.73±9.17	0.219±0.32	-19.08±1.03
0.8	71.87±2.02	3.94±0.20	176.68±6.98	0.156±0.27	-28.91±1.18
1.0	78.65±1.68	4.42±0.15	177.09±7.54	0.166±0.12	-33.68±1.89
1.2	72.41±1.11	3.89±0.21	185.72±8.06	0.178±0.18	-30.43±1.74
1.5	54.47±1.03	2.84±0.17	248.69±11.14	0.196±0.09	-27.01±1.31

PLGA 用量为 500 mg 有机溶剂为丙酮和二氯甲烷等量混合溶剂,油水体积比为 1:5,乳化剂质量分数为 1.0%,超声功率为 250 W,减压旋蒸为 3 h 条件下,分别考察超声时间对 THP-PLGA-NPs 的影响,结果见表 5。随着超声时间的增加,包封率、载药量和 Zeta 电位绝对值均先增加后减小,可能是超声时间过长时对 PLGA 纳米粒有一定的破坏作用所

致。粒径和 PDI 值先变小后变大,可能是过长的超声时间使纳米粒重新聚集,导致平均粒径变大,同时 PDI 值也上升。虽然超声 12 min 具有较小的粒径,但包封率和载药量明显低于超声 10 min 时的包封率和载药量,且超声 12 min 时的 PDI 值也相对较高。综合考虑,故选择超声时间为 10 min。

2.4.6 超声功率的影响 固定 THP 用量为 30 mg,

表 5 超声时间的考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Investigation of ultrasonic time ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

超声时间/min	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
5	71.35±1.66	3.85±0.12	268.76±15.54	0.247±0.38	-27.14±1.21
8	75.48±2.08	4.23±0.18	209.26±11.17	0.173±0.23	-30.19±1.36
10	78.65±1.73	4.42±0.21	178.56±9.67	0.159±0.17	-32.33±1.90
12	73.86±1.41	4.12±0.14	171.04±6.95	0.197±0.21	-28.94±1.82
15	60.04±1.96	3.31±0.16	217.81±7.48	0.233±0.26	-29.07±1.74

PLGA 用量为 500 mg,有机溶剂为丙酮和二氯甲烷等量混合溶剂,油水体积比为 1:5,乳化剂质量分数为 1.0%,超声时间为 10 min,减压旋蒸为 3 h 条件下,考察超声功率对 THP-PLGA-NPs 包封率、载药量、粒径、PDI 和 Zeta 电位的影响,结果见表 6。超声功率达到 300 W 时,THP-PLGA-NPs 的封率和载药量下降明显,粒径和 PDI 值变大趋势明显。功率为 200 W 时 THP-PLGA-NPs 包封率、载药量相对最高,且粒径和 PDI 值相对最小,故选择超声功率为 200 W。

2.4.7 减压旋蒸时间的影响 固定 THP 用量为 30 mg,PLGA 用量为 500 mg,有机溶剂为丙酮和二氯甲烷等量混合溶剂,油水体积比为 1:5,乳化剂质量分数为 1.0%,超声时间为 10 min,超声功率为 200 W 的条件下,考察减压旋蒸时间对 THP-PLGA-NPs 包封率、载药量、粒径、PDI 和 Zeta 电位的影响,结果见表 7。减压旋蒸时间过短时,可能是由于残留的有机溶剂会破坏 THP-PLGA-NPs,导致包封率、载药量较低,但旋蒸时间过长时 THP-PLGA-NPs 可能会发生聚集,导致粒径和 PDI 值变大。经

表 6 超声功率的考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Investigation of ultrasonic power ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

超声功率/W	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
100	74.14±1.16	4.01±0.13	276.18±15.41	0.191±0.27	-25.63±1.36
150	78.66±2.04	4.26±0.15	224.83±14.69	0.163±0.20	-27.01±1.13
200	83.69±1.58	4.67±0.08	172.74±7.18	0.135±0.14	-32.91±1.74
250	77.17±1.07	4.21±0.11	179.06±6.44	0.188±0.19	-26.22±1.57
300	64.52±1.33	3.39±0.19	206.79±10.23	0.217±0.23	-27.86±1.65

表 7 减压旋蒸时间的考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Investigation of decompression rotary steaming time ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

减压旋蒸时间/h	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
2.0	47.35±1.72	2.60±0.08	236.43±13.42	0.384±0.41	-21.16±1.78
2.5	69.19±1.27	3.94±0.12	240.11±11.08	0.226±0.34	-22.86±1.86
3.0	82.05±1.53	4.49±0.16	176.07±9.16	0.151±0.29	-32.85±1.34
3.5	85.84±1.34	4.78±0.21	163.16±7.86	0.106±0.15	-34.07±1.21
4.0	83.17±1.33	3.50±0.18	216.50±10.14	0.172±0.20	-26.27±1.66

测定, 旋蒸时间为 3.5 h 时有机溶剂基本被旋蒸除去, 故选择旋蒸时间为 3.5 h。

2.5 BBD-RSM 优化处方

2.5.1 试验设计 单因素实验结果显示, PLGA 材料的用量、油水体积比和乳化剂质量分数 (分别作为自变量 X_1 、 X_2 、 X_3) 对纳米制剂的包封率、载药量和粒径大小 (分别作为响应值 Y_1 、 Y_2 、 Y_3) 影响较大, 因此采用 BBD-RSM 对 THP-PLGA-NPs 处方进行进一步优化, 因素及水平试验设计见表 8。

将包封率、载药量和粒径归一化处理得出总评归一值 (OD), 并以 OD 值为 BBD-RSM 的响应指标。计算过程为①包封率 (d_1) 和载药量 (d_2) 越大越好, $d_{\max} = (M_i - M_{\min}) / (M_{\max} - M_{\min})$; 而粒径 (d_3) 越小越好, $d_{\min} = (M_{\max} - M_i) / (M_{\max} - M_{\min})$, M_{\max} 和 M_{\min} 分别为试验中最大值和最小值, M_i 为试验中的测量值。②各指标归一值求算几何平均数, 得总评归一值 $OD = (d_1 d_2 \cdots d_k)^{1/k}$, k 为指标数, 结果见表 8。

2.5.2 模型的拟合、效应面优化与预测 采用 Design Expert V8.0.6 软件进行拟合, 总评分 OD 值二次多元回归方程为 $OD = 0.96 - 0.020 X_1 + 0.017 X_2 + 0.067 X_3 - 0.024 X_1 X_2 + 0.3.16 \times 10^{-3} X_1 X_3 + 0.040 X_2 X_3 - 0.270 X_1^2 - 0.061 X_2^2 - 0.610 X_3^2$ 。模型的 P 值 < 0.01 , 说明模型具有极显著性意义, 失拟

项 $P = 0.149 9 > 0.05$, 说明未知因素对模型干扰很小。另外模型的 $R^2 = 0.995 8$, $R_{\text{adj}}^2 = 0.990 4$, 说明模型与实际吻合度良好, 因此可以采用此模型对 THP-PLGA-NPs 处方进行研究, 可信度较高。方差分析结果见表 9, 模型中 X_3 、 $X_2 X_3$ 、 X_1^2 、 X_2^2 和 X_3^2 均显著或极显著 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

固定 PLGA 材料的用量 (X_1)、油水体积比 (X_2) 和乳化剂质量分数 (X_3) 因素中之一, 得到另外 2 因素对 OD 值的三维曲面图, 结果见图 2。得到 THP-PLGA-NPs 最佳处方为 PLGA 用量为 491.8 mg、油水体积比 1 : 5.2、乳化剂质量分数为 1.12%。在此条件下 THP-PLGA-NPs 包封率、载药量和粒径大小的预测值分别为 85.95%、4.85% 和 176.46 nm。

2.6 工艺验证

分别测定 3 批 THP-PLGA-NPs 最佳处方的包封率、载药量和粒径, 并与预测值相比较, 计算实际值与预测值的偏差 [偏差 = (预测值 - 实际值) / 预测值]。结果见表 10, 实际值与预测值相对偏差均较小, 均小于 $\pm 5\%$, 说明 THP-PLGA-NPs 实际测得的包封率、载药量和粒径大小与预测值较为接近, 证明了采用 Box-Behnken 响应面法优化 THP-PLGA-NPs 处方具有良好的预测性, 可靠性较高。THP-PLGA-NPs 粒径分布图和 Zeta 电位图分别见图 3 和图 4。

2.7 THP-PLGA-NPs 外观及 SEM 观察

THP-PLGA-NPs, 外观见图 5-A, 略带浅蓝色乳

表 8 BBD-RSM 试验设计的因素水平及结果

Table 8 Experiment results of Box-Behnken

序号	X_1/mg	X_2	$X_3/\%$	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	Y_3/nm	OD
1	450 (-1)	1 : 5 (0)	0.5 (-1)	62.65	3.74	253.17	0.000
2	500 (0)	1 : 4 (-1)	1.5 (+1)	64.98	3.68	213.08	0.277
3	500 (0)	1 : 5 (0)	1.0 (0)	85.41	4.78	174.25	0.921
4	500 (0)	1 : 5 (0)	1.0 (0)	86.02	4.86	179.62	0.958
5	450 (-1)	1 : 6 (+1)	1.0 (0)	78.95	4.77	182.34	0.705
6	550 (+1)	1 : 5 (0)	1.5 (+1)	74.14	3.73	251.56	0.171
7	550 (+1)	1 : 5 (0)	0.5 (-1)	57.18	2.84	219.31	0.000
8	450 (-1)	1 : 5 (0)	1.5 (+1)	58.08	3.58	207.95	0.183
9	500 (0)	1 : 6 (+1)	1.5 (+1)	73.41	3.96	211.47	0.401
10	500 (0)	1 : 6 (+1)	0.5 (-1)	66.18	3.64	224.18	0.228
11	450 (-1)	1 : 4 (-1)	1.0 (0)	74.35	4.60	189.35	0.632
12	500 (0)	1 : 5 (0)	1.0 (0)	86.34	4.91	177.15	0.980
13	500 (0)	1 : 4 (-1)	0.5 (-1)	64.73	3.52	211.18	0.266
14	550 (+1)	1 : 6 (+1)	1.0 (0)	82.43	4.15	204.67	0.585
15	550 (+1)	1 : 4 (-1)	1.0 (0)	78.12	3.91	183.14	0.266
16	500 (0)	1 : 5 (0)	1.0 (0)	85.48	4.79	175.83	0.956
17	500 (0)	1 : 5 (0)	1.0 (0)	87.03	4.86	176.09	0.984

表 9 方差分析

Table 9 Analysis of variance

误差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	2.02	9	2.02	184.19	$< 0.000 1$
X_1	3.13×10^{-3}	1	3.13×10^{-3}	2.57	0.152 9
X_2	2.34×10^{-3}	1	2.34×10^{-3}	1.92	0.208 4
X_3	0.036	1	0.036	29.81	0.000 9
$X_1 X_2$	2.24×10^{-3}	1	2.24×10^{-3}	1.83	0.218 6
$X_1 X_3$	4.01×10^{-5}	1	4.01×10^{-5}	0.033	0.861 2
$X_2 X_3$	6.56×10^{-3}	1	6.56×10^{-3}	5.38	0.049 3
X_1^2	0.30	1	0.30	244.61	$< 0.000 1$
X_2^2	0.016	1	0.016	13.00	0.008 7
X_3^2	1.54	1	1.54	1 266.72	$< 0.000 1$
残差	8.52×10^{-3}	7	1.218×10^{-3}		
失拟项	5.97×10^{-3}	3	1.992×10^{-3}	3.12	0.149 9
绝对误差	2.55×10^{-3}	4	6.373×10^{-3}		
总和	2.03	16			

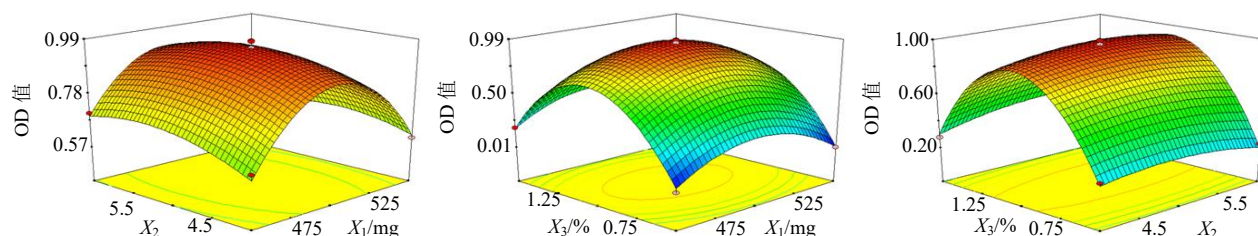


图 2 各因素与响应值的三维图

Fig. 2 Three-dimensional plot of independent factors and response values

表 10 预测值和实际值的比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 10 Comparison of predictive value and actual value ($\bar{x} \pm s, n=3$)

评价指标	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
实际值	85.07±1.06	4.73±0.21	181.32±7.14
预测值	85.95	4.85	176.46
偏差/%	1.02	2.47	2.75

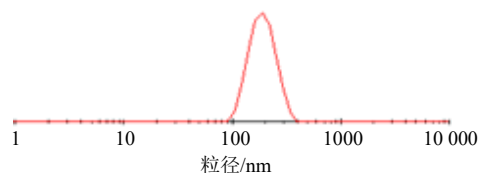


图 3 THP-PLGA-NPs 的粒径分布

Fig. 3 Particle size distribution of THP-PLGA-NPs

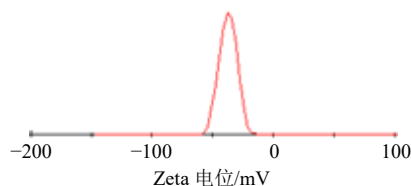


图 4 THP-PLGA-NPs 的 Zeta 电位

Fig. 4 Zeta potential of THP-PLGA-NPs

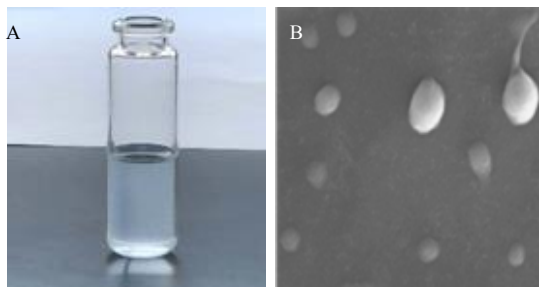


图 5 THP-PLGA-NPs 的外观 (A) 及 SEM 图 (B)

Fig. 5 Appearance (A) and SEM (B) of THP-PLGA-NPs

光。取 THP-PLGA-NPs 混悬液 0.1 mL, 加入 10 mL 蒸馏水, 混匀滴于铜柱, 并常温下自然挥干, 于真空条件下喷金后置于 SEM 下观察 THP-PLGA-NPs 外貌形态, 结果见图 5-B。THP-PLGA-NPs 外貌形态为椭圆形或球形粒子, 各个粒子之间无粘连。

2.8 THP-PLGA-NPs 冻干粉的制备

2.8.1 冻干工艺及结果 取 THP-PLGA-NPs 混悬液加入一定量的冻干保护剂, 混匀, 于 -60°C 超低温冰箱预冻 1 d。置于 -35°C 冷冻干燥机中按照表 11 冻干程序进行冻干, 即得不同质量分数、不同种类冻干保护剂的 THP-PLGA-NPs 的冻干粉末, 分别评价冻干粉的外观、色泽和分散时间, 结果见表 12。

蔗糖作为冻干保护剂时外观、色泽和分散时间均不理想, 当乳糖质量分数大于 6% 时虽外观和色泽较为理想, 但分散时间稍长, 故最终选择 6% 的甘露醇作为 THP-PLGA-NPs 的冻干保护剂, 外观饱

表 11 冻干程序

Table 11 Freeze-drying procedure

阶段	变动点	温度/ $^{\circ}\text{C}$	时间/h
预冻期	1	-60	24
	1	-35	8
升华期	2	-30	8
	3	-25	8
解析期	1	0	6
	2	15	4
	3	25	2

表 12 考察结果 ($n=3$)Table 12 Results of investigation ($n=3$)

试验编号	冻干保护剂种类及用量			考察项		
	乳糖/%	蔗糖/%	甘露醇/%	外观	色泽	分散时间/s
1	4			轻微塌陷	不均一	<10 s
2	6			饱满	均一	10~15 s
3	8			饱满	均一	10~15 s
4		4		塌陷	不均一	15~30 s
5		6		塌陷	不均一	>60 s
6		8		轻微塌陷	不均一	>60 s
7			4	轻微塌陷	不均一	<10 s
8			6	饱满	均一	<10 s
9			8	饱满	均一	15~30 s

满, 色泽均一, 分散时间小于 10 s。冻干粉外观见图 6。

2.8.2 THP-PLGA-NPs 冻干粉稳定性考察 取 THP-PLGA-NPs 混悬液置于干燥器中, 分别于 0、3、6、9、12、15、18、21、24、27、30 d 取 0.1 mL, 加入



图 6 冻干粉外观

Fig. 6 Appearance of lyophilized powder

蒸馏水 4 mL 稀释混匀, 记录粒径和 Zeta 电位。取 THP-PLGA-NPs 冻干粉适量, 0.1 mL 蒸馏水复溶后同法操作, 结果见表 13。未冻干时, THP-PLGA-NPs 30 d 后包封率下降超过 20%, 而冻干后包封率下降 3% 左右。未冻干时, 30 d 后粒径增长至 (343.94 ± 36.48) nm, 而冻干后粒径增长幅度明显较小。THP-PLGA-NPs 冻干后 PDI 虽有变大趋势, 但 30 d 后仍小于 0.3。因此, 将 THP-PLGA-NPs 混悬液制备成冻干粉后有助于增加其稳定性。

2.9 体外释药行为研究及模型拟合

取适量 THP-PLGA-NPs 冻干粉 (含 10.0 mg 的 THP), 加入 3 mL 1.0% SDS 水溶液, 置于活化的透析袋中, 两端扎紧。取含 10 mg THP 溶液置于透析袋, 同法操作。采用释放介质为 1.0% SDS 水溶液 900 mL, 设置溶出试验仪的温度为 (37 ± 1) °C, 转速为 100 r/min, 于 0、0.5、1、1.5、2、3、4、6、

表 13 稳定性试验 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 13 Stability experiments ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

测定时间/d	包封率/%		粒径/nm		PDI	
	冻干前	冻干后	冻干前	冻干后	冻干前	冻干后
0	84.83 ± 1.26	80.15 ± 1.32	179.90 ± 6.43	206.71 ± 9.04	0.096 ± 0.110	0.147 ± 0.120
3	85.01 ± 0.93	78.57 ± 0.83	177.16 ± 8.05	203.15 ± 7.35	0.112 ± 0.090	0.162 ± 0.150
6	83.75 ± 1.14	79.01 ± 0.90	189.27 ± 7.81	208.27 ± 8.16	0.108 ± 0.110	0.158 ± 0.130
9	80.29 ± 0.95	78.49 ± 0.68	193.42 ± 5.90	206.93 ± 8.69	0.125 ± 0.130	0.165 ± 0.190
12	77.90 ± 1.01	79.33 ± 0.85	197.63 ± 9.25	209.02 ± 9.23	0.148 ± 0.160	0.168 ± 0.200
15	77.47 ± 0.96	78.05 ± 0.58	206.17 ± 9.86	208.61 ± 7.85	0.167 ± 0.190	0.157 ± 0.210
18	75.23 ± 0.86	77.71 ± 0.45	229.07 ± 13.68	211.14 ± 9.07	0.199 ± 0.230	0.179 ± 0.180
21	73.18 ± 0.69	78.06 ± 0.72	257.77 ± 16.84	210.43 ± 8.61	0.256 ± 0.290	0.173 ± 0.170
24	70.41 ± 0.78	77.43 ± 0.64	279.02 ± 21.06	209.72 ± 10.11	0.288 ± 0.330	0.178 ± 0.250
27	66.16 ± 0.64	76.48 ± 0.50	296.53 ± 29.07	213.60 ± 9.77	0.342 ± 0.270	0.192 ± 0.220
30	61.38 ± 0.67	77.12 ± 0.62	343.94 ± 36.48	211.86 ± 10.38	0.387 ± 0.340	0.197 ± 0.230

8、12、24、36、48 h 分别取样 3 mL, 并立即补加空白释放介质 3 mL。8500 r/min 高速离心 30 min 后进入 HPLC 测定 THP 质量浓度, 计算含量及各个时间点的累积释放度, 结果见图 7。THP 原料药在 4 h 内基本释放完毕, 累积释放度达到 97.19%。THP-PLGA-NPs 整个释药过程分为快速释药期和缓慢释药期, 在 0~6 h 时间段释药相对较快, 之后表现出明显的缓释特征, 48 h 内的累积释放度为 72.67%。

对 THP-PLGA-NPs 体外释药机制进行拟合, 结果见表 14。由相关系数 r 可知, THP-PLGA-NPs 体外释药符合 Higuchi 模型: $M_t/M_\infty = 0.112 \ 4 \ t^{1/2} +$

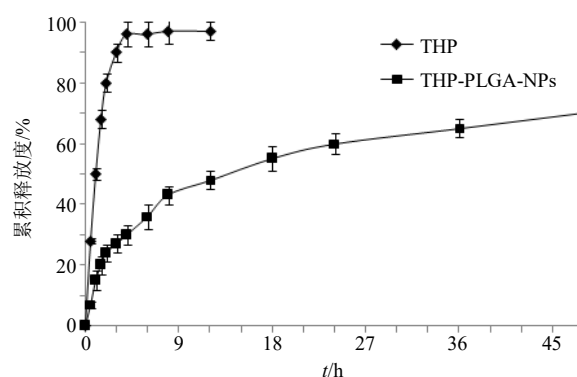


图 7 体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 7 Release profiles *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 14 药物释放模型和相关系数

Table 14 Fitting release model and coefficient

模型	拟合方程	<i>r</i>
零级模型	$M_t/M_\infty = 0.018\ 3\ t + 0.212\ 8$	0.908 1
一级模型	$\ln(1 - M_t/M_\infty) = -0.031\ 3\ t - 0.221\ 5$	0.929 5
Higuchi 模型	$M_t/M_\infty = 0.112\ 4\ t^{1/2} + 0.078\ 0$	0.987 9
Weibull 模型	$\ln[-\ln(1 - M_t/M_\infty)] = 0.624\ 3\ \ln t - 1.932\ 3$	0.964 3

M_∞ 为 ∞ 时累积释放量, M_t 为 t 时间累积释放量, M_t/M_∞ 为 t 时间累积释放百分率, t 为时间

M_∞ is accumulative drug-release at time ∞ , M_t is accumulative drug-release at time t , M_t/M_∞ is accumulative release rate at time t , t is time

0.078 0, $r = 0.987\ 9$ 。

3 讨论

在制备 THP-PLGA-NPs 时, 油相加入到水相的方式如注射器滴加法、直接注入法等对粒径有一定影响, 结果显示注射器滴加得到的 THP-PLGA-NPs 粒径分布更为均匀, PDI 值更小。可能是由于注入法对滴速较难控制, 导致有机相在水相中分布不均匀, 影响了有机相与水相间的溶剂交换过程, 从而纳米粒的形成过程产生影响^[17], 这点需要研究者加以注意。完全将纳米药物与游离药物分离的难度较大, 而且据研究显示^[18-19]纳米药物与游离药物之间存在动态平衡, 将游离药物分离除去可能会对纳米制剂的稳定性产生不利影响, 故本研究不再分离游离药物。

PLGA 材料用量对纳米粒包封率、载药量及粒径大小均存在一定影响。一般来讲, 载体用量越大, 纳米制剂的包封率越高, 但过多的载体用量不仅会影响载药量, 也会影响体系的黏度, 最终导致纳米粒径升高, 因此, 合适的载体用量是 THP-PLGA-NPs 的关键因素之一。油水比例也会影响 PLGA 纳米粒质量, 水相比比例较大时有助于降低体系黏度, 从而使纳米粒更易分散, 得到的粒径较小。但较大的水相比比例会增加乳化剂用量, 使药物因增溶作用进入水相, 最终影响纳米制剂的包封率及载药量。当水相过小时, 则会造成纳米粒不易分散, 从而发生团聚, 最终使粒径及 PDI 增大。

本研究采用的乳化剂泊洛沙姆 188 具有巨大的空间位阻效应, 有助于提高 PLGA 纳米粒的稳定性, 但其质量分数大小也影响着纳米制剂的包封率、载药量及粒径大小。因此, 选用 PLGA 用量、油-水比例和乳化剂质量分数为主要影响因素, 采用 Box-Behnken 响应面法来优化 THP-PLGA-NPs 处方。

前期研究显示, THP-PLGA-NPs 放置稳定性存在较大问题, 当直接采用冷冻干燥法制备成冻干粉时, 其粒径及 PDI 值明显变大, 且包封率下降明显。可能是由于在冻干过程中随着水分的除去, 纳米粒子之间出现聚集、融合等现象, 使粒径增加, 且分布不规则, 最终使粒径及 PDI 值变大。形成的冰晶也会对纳米粒形成“固化损伤”, 导致药物泄露, 造成包封率下降^[20]。加入保护剂后, 可有效阻止纳米粒子聚集, 降低或避免“固化损伤”, 降低冷冻干燥过程中 THP-PLGA-NPs 混悬液的脱水速度及皱缩程度, 因而 THP-PLGA-NPs 混悬液制备成冻干粉后稳定性得到较大改善。

本研究分别采用不同质量浓度的乳糖、蔗糖、甘露醇等制备 THP-PLGA-NPs 的冻干粉。并以冻干粉外观、色泽和分散时间为指标最终筛选出 6%甘露醇作为 THP-PLGA-NPs 冻干剂时效果最佳。这可能是在冻干过程中的升华期或解析期时, 甘露醇分子结构中的 OH⁻可与 PLGA 纳米粒表面形成氢键^[21-22], 在逐渐脱水过程中与水分子进行同步交换, 最大程度发挥了保护作用。

体外释药研究结果显示, 制备的 THP-PLGA-NPs 体外释药分为快速释药期和缓慢释药期。快速释药阶段可能是由于未包裹进入纳米粒的游离药物所致。另外, 分散于纳米粒表面乳化层、浅表层或表层的药物放出去需克服的屏障较少, 因而释药相对容易, 最终出现了快速释药期。缓慢释药期可能是由于包裹于 PLGA 纳米粒内部的药物释药出去需克服的屏障相对较多, 因而出现了缓慢释药期。这种包含快速释药期和缓慢释药期对药物体内药动学、药效学的影响还需进一步研究。本研究成功制备了粒径约为 200 nm 的 THP-PLGA-NPs, 由于载体的包裹作用有助于提高 THP 的体内稳定性, 也为提高药物的生物利用度、改变体内组织分布、降低药物毒副作用、增强药效等奠定了基础^[8,23-24]。接下来将开展药动学、药效学等评价, 后续将作进一步的科研报道。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 145-146.
- [2] 王安铸, 马晓昌. 延胡索乙素的研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(4): 1927-1929.
- [3] 于定荣, 翁小刚, 王本晓, 等. 延胡索、白芷炮制配伍对元胡止痛方中延胡索乙素、欧前胡素含量以及镇痛

- 作用的影响 [J]. 中草药, 2021, 52(8): 2306-2312.
- [4] 赵芳, 杨云汉, 赵雪秋, 等. 延胡索乙素与 β -环糊精及其衍生物的包合行为研究 [J]. 中草药, 2018, 49(15): 3609-3618.
- [5] 李阳杰, 周敬. 延胡索乙素纳米结构脂质载体的制备及其药动学行为 [J]. 中成药, 2019, 41(12): 2990-2993.
- [6] 梁卓, 孙艺丹, 王锐利, 等. 延胡索乙素在不同溶剂中平衡溶解度及其油水分配系数的测定 [J]. 中国药物与临床, 2012, 12(8): 984-986.
- [7] 邵敬宝, 王群星, 石楠, 等. 延胡索总生物碱的急性毒性及其镇痛作用研究 [J]. 浙江中医药大学学报, 2019, 43(10): 1156-1161.
- [8] 高彩芳, 夏加璇, 朱颖, 等. 纳米技术在改善中药有效成分成药性中的应用 [J]. 中草药, 2018, 49(12): 2754-2762.
- [9] 李洁丽, 郑春丽, 刘建平, 等. 多柔比星 PLGA 纳米粒的处方工艺优化及体外释药行为研究 [J]. 药学学报, 2013, 48(5): 759-766.
- [10] 王婴, 李木生, 吴瑞婵, 等. 星点设计-效应面法优化青藤碱聚乳酸-羟基乙酸纳米粒的制备工艺 [J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(2): 232-237.
- [11] 管庆霞, 夏昭睿, 王艳宏, 等. 包载马钱子碱聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒处方工艺优化及其特性研究 [J]. 中草药, 2021, 52(4): 951-961.
- [12] 陈坚平, 方玉婵, 申楼. 熊果酸-PLGA 纳米粒的工艺研究及其表征 [J]. 中药材, 2016, 39(10): 2315-2317.
- [13] Rençber S, Aydın Kose F, Karavana S Y. Dexamethasone loaded PLGA nanoparticles for potential local treatment of oral precancerous lesions [J]. *Pharm Dev Technol*, 2020, 25(2): 149-158.
- [14] Allavena P, Palmioli A, Avigni R, et al. PLGA based nanoparticles for the monocyte-mediated anti-tumor drug delivery system [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2020, 16(2): 212-223.
- [15] 谢青璇, 李小芳, 谢龙, 等. Box-Behnken 效应面法优化大黄素/小檗碱-壳聚糖双载药纳米粒的处方工艺研究 [J]. 中草药, 2021, 52(6): 1614-1622.
- [16] 颜洁, 关志宇, 朱卫丰, 等. Box-Behnken 效应面法优化自组装法制备葛根素壳聚糖/海藻酸钠口服纳米粒的处方与工艺研究 [J]. 中草药, 2019, 50(23): 5706-5713.
- [17] 李晴宇, 叶晓莉, 陈玲, 等. 姜黄素 PLGA 纳米粒的制备及制剂学性质分析 [J]. 实用药物与临床, 2016, 19(6): 753-757.
- [18] 郝海军, 屈战果, 范明松. 隐丹参酮纳米结构脂质载体的制备及药动学研究 [J]. 中成药, 2020, 42(4): 831-835.
- [19] 李超英, 侯世祥, 阳长明, 等. 葫芦素毫微粒冻干针剂的研究 [J]. 中国中药杂志, 2001, 26(5): 315-317.
- [20] 吴超群, 李小芳, 牟倩倩, 等. 甘草总黄酮纳米混悬剂冻干粉的表征及稳定性考察 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(2): 29-33.
- [21] 胡瑞瑞, 张家梁, 郝海军. 葫芦素 B 磷脂复合物纳米结构脂质载体的制备 [J]. 中成药, 2019, 41(11): 2571-2576.
- [22] 毛艳婷, 马姝丽, 白朝辉, 等. 木犀草素纳米结构脂质载体及其冻干粉的制备和体外释药研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2020, 40(23): 2423-2429.
- [23] 李晓婷, 决利利, 郝海军, 等. 隐丹参酮纳米混悬剂的制备及其抗肿瘤活性 [J]. 中成药, 2021, 43(1): 6-10.
- [24] 刘会珍, 董丹丹, 范明松. 不同厚朴酚制剂的制备、表征及其在 SD 大鼠体内药动学行为比较 [J]. 中草药, 2020, 51(17): 4442-4448.

[责任编辑 郑礼胜]