

# 基于偏最小二乘-判别分析法评价<sup>60</sup>Co-γ射线对赶黄草中有效成分的影响

崔永伟 （南京市溧水区中医院药剂科 南京 211200）

**摘要 目的：**考察<sup>60</sup>Co-γ射线辐照灭菌对赶黄草中6种成分（原儿茶酸、没食子酸、槲皮素、芦丁、芹菜素和山柰酚）含量的影响。**方法：**分别选择剂量为0,2,5,8 kGy的<sup>60</sup>Co-γ射线对赶黄草药材进行辐照。采用Waters Sunfire ODS C<sub>18</sub>色谱柱（250 mm×4.6 mm,5 μm），流动相为A-乙腈,B-0.05%磷酸水溶液系统，梯度洗脱，检测波长340 nm，流速为1.0 ml·min<sup>-1</sup>，柱温35℃，比较辐照前后活性成分含量变化，采用偏最小二乘-判别分析（PLS-DA）对其总体质量进行分析评价。**结果：**赶黄草药材中原儿茶酸、没食子酸、槲皮素、芦丁、芹菜素和山柰酚分别在0.069~1.727 mg·ml<sup>-1</sup>、0.012~0.311 mg·ml<sup>-1</sup>、0.038~0.945 mg·ml<sup>-1</sup>、0.031~0.780 mg·ml<sup>-1</sup>、0.005~0.126 mg·ml<sup>-1</sup>、0.008~0.208 mg·ml<sup>-1</sup>范围内呈良好线性，平均加样回收率分别为99.9%、99.5%、99.9%、99.5%、98.6%和97.2%。辐照剂量不超过5 kGy时，各组分含量差异无统计学意义（*P*>0.05），PLS-DA可将不同辐照处理的样品显著分类，并筛选出导致质量差异的5个差异标志物。**结论：**为保证药品安全有效，采用<sup>60</sup>Co-γ射线对赶黄草药材进行灭菌时，辐照剂量不宜超过5 kGy。

**关键词** 赶黄草；有效成分；含量；<sup>60</sup>Co-γ射线辐照灭菌；偏最小二乘法-判别分析

中图分类号:TQ460.7<sup>+</sup>2 文献标识码:A 文章编号:1008-049X(2022)03-0530-04

DOI:10.19962/j.cnki.issn1008-049X.2022.03.029

## Effects of <sup>60</sup>Co-γ Irradiation on the Constituents in *Penthorum Chinense* Pursh. Based on PLS-DA

Cui Yongwei(Nanjing Lishui District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 211200, China)

**ABSTRACT Objective:** To study the effects of <sup>60</sup>Co-γ ray irradiation on the contents of protocatechuic acid, gallic acid, quercetin, rutin, apigenin and kaempferol in *Penthorum chinense* Pursh. **Methods:** A Waters Sunfire ODS C<sub>18</sub> column (250 mm×4.6 mm,5 μm) was adopted and the wavelength of UV detection was 340 nm at the flow rate of 1.0 ml·min<sup>-1</sup>. The mobile phase consisted of acetonitrile(A) and 0.05% phosphoric acid (B) with gradient elution. The column temperature was set at 35℃. The irradiation doses were 0, 2, 5 and 8 kGy, respectively. The contents of the active ingredients were compared before and after irradiation, and the further quality assessment of the herb was carried out by discriminant analysis of partial least squares (PLS-DA). **Results:** The linear range of protocatechuic acid, gallic acid, quercetin, rutin, apigenin and kaempferol was 0.069-1.727, 0.012-0.311, 0.038-0.945, 0.031-0.780, 0.005-0.126 mg·ml<sup>-1</sup> and 0.008-0.208 mg·ml<sup>-1</sup>, respectively. The average recoveries were 99.9%, 99.5%, 99.9%, 99.5%, 98.6% and 97.2%, respectively. When the radiation dose was not more than 5 kGy, the content differences of five components had no statistical significance (*P*>0.05), and PLS-DA screened out 5 differential markers leading to the quality differences by radiant dose. **Conclusion:** To ensure the safety and efficacy of *Penthorum chinense* Pursh., the irradiation dose of <sup>60</sup>Co-γ should be not more than 5 kGy

**KEY WORDS** *Penthorum chinense* Pursh.; Constituents; Content;<sup>60</sup>Co-γ ray radiant sterilization; Discriminant analysis of partial least squares

赶黄草为苗族人世代习用,称之为“神仙草”,主要分布在我国云、贵、川交界的乌蒙山系地带,四川省境内资源丰富,为虎耳草科扯根菜属植物扯根菜 *Penthorum chinense* Pursh. 的干燥地上部分<sup>[1,2]</sup>。赶黄草具有活血散瘀、清热解毒、退黄化湿、利水消肿之功效。现代药理学研究表明<sup>[3~6]</sup>,赶黄草具有抗炎、抗氧化、保护肝损伤及治疗肾病综合征等作用,对肝脏疾病疗效尤为明显,被苗族视为治疗肝病的首选药物。赶黄草含有多种活性成分,包括木脂素类、香豆素类、苯乙酮类、鞣质类、三萜类、有机酸类、酯类和挥发油等<sup>[7~10]</sup>。

偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)是建立在偏最小二乘法(PLS)基础上的一种监督模式识别方法,分析结果直观、清晰,具有较高的预测精度,在中药质量评价和控制中广泛运用<sup>[11~13]</sup>。<sup>60</sup>Co-γ射线具有保鲜、杀虫灭菌、抑制发芽等作用,与传统灭菌方式相比,其穿透力强,而灭菌体表面及质量影响甚微<sup>[14]</sup>,<sup>60</sup>Co-γ射线辐照灭菌具有经济、高效、稳定等优势,现已经成为中药材灭菌的主要方式之一<sup>[15,16]</sup>。<sup>60</sup>Co-γ射线辐照灭菌也存在一定缺陷,随着辐照剂量加大以及辐照次数增多,可导致部分中药材有效成分含量降低,影响临床治疗效果,因此应

通信作者:崔永伟 Tel:13951706822 E-mail:xiaol60501@163.com

开展药材的<sup>60</sup>Co-γ 射线辐照的安全性、有效性和稳定性等方面验证工作<sup>[17]</sup>,确保药品质量。

本研究拟采用 HPLC 法,考察不同剂量<sup>60</sup>Co-γ 射线辐照灭菌后对赶黄草活性成分(原儿茶酸、没食子酸、槲皮素、芦丁、芹菜素、山柰酚)含量的影响,并采用 PLS-DA 法分析不同剂量辐照灭菌引起含量差异的因素,为生产灭菌提供参考依据。

1 仪器与试药

2695 型高效液相色谱仪(2996DAD 检测器,美国沃特世公司);AL104 型电子分析天平( $d = 0.01\text{ mg}$ ,瑞士梅特勒-托利多公司);A11 型分析粉碎机(德国 IKA 公司);KQ-250DBG 型数控超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

原儿茶酸对照品(批号:110809-201906,纯度 97.7%)、没食子酸对照品(批号:110831-201906,纯度 91.5%)、槲皮素对照品(批号:100081-201610,纯度 99.1%)、芦丁对照品(批号:100080-201811,纯度 91.7%)、芹菜素对照品(批号:111901-202004,纯度 99.4%)、山柰酚对照品(批号:110861-202013,纯度 93.2%)均购自中国食品药品检定研究院。赶黄草药材系自采(表 1),经作者鉴定为虎耳草科植物扯根菜 *Penthorum chinense* Pursh. 的干燥地上部分。甲醇、乙腈均为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

表 1 赶黄草药材信息

| 编号 | 采样地点 | 采收日期            |
|----|------|-----------------|
| Y1 | 四川古蔺 | 2019 年 7 月 1 日  |
| Y2 | 四川双沙 | 2019 年 8 月 9 日  |
| Y3 | 四川民乐 | 2019 年 7 月 6 日  |
| Y4 | 四川双文 | 2019 年 8 月 4 日  |
| Y5 | 四川石宝 | 2020 年 9 月 12 日 |
| Y6 | 四川古蔺 | 2020 年 9 月 25 日 |

2 方法与结果

2.1 色谱条件<sup>[18]</sup>

色谱柱:Waters Sunfire ODS  $C_{18}$  ( $250\text{ mm} \times 4.6\text{ mm}, 5\text{ }\mu\text{m}$ );流动相:乙腈(A)-0.05%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~5 min,10% A;5~10 min,10%→15% A;10~25 min,15% A;25~38 min,15%→30% A;38~55 min,30%→50% A;55~65 min,50% A;70~75 min,50% A→10% A);检测波长:340 nm;进样量:20  $\mu\text{l}$ ;柱温:35℃;流速:1.0  $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

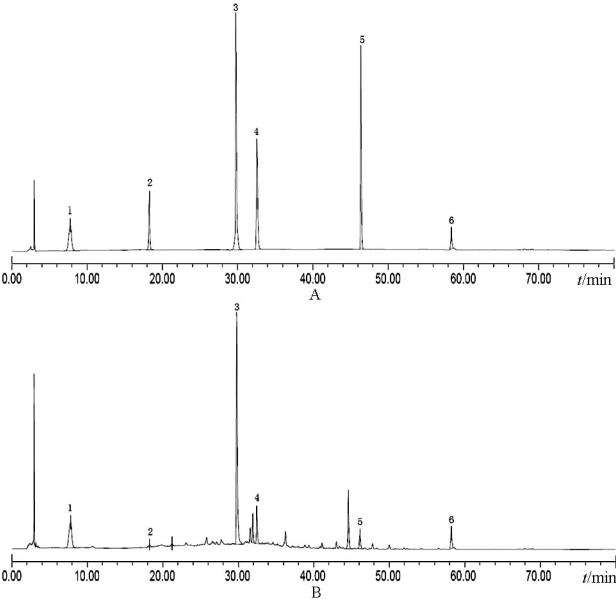
2.2 混合对照品溶液的制备

精密称取原儿茶酸、没食子酸、槲皮素、芦丁、芹菜素、山柰酚对照品各适量,加甲醇制成每 1 ml 分别含原儿茶酸 3.454 mg、没食子酸 0.622 mg、槲皮素 1.889 mg、芦丁 1.560 mg、芹菜素 0.252 mg、山

柰酚 0.416 mg 的混合对照品贮备液;精密量取对照品贮备液 1 ml,置 10 ml 量瓶中,加乙醇稀释至刻度,混匀,0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,取续滤液,即得混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

将赶黄草药材阴干,粉碎,过 4 号筛,取粉末备用。取药材粉末约 1.0 g,精密称定,置 100 ml 具塞锥形瓶中,加 60%乙醇 30 ml,称定重量,超声处理(250 W,40 kHz) 1h,放冷,再称定重量,用 60%乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过(0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜),取续滤液,即得供试品溶液。



A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液

1. 没食子酸 2. 原儿茶酸 3. 芦丁 4. 槲皮素  
5. 芹菜素 6. 山柰酚

图 1 赶黄草高效液相色谱图

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 取混合对照品贮备液,分别精密吸取 0.4,0.8,1,2,3,5,10 ml,至 20 ml 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,取续滤液注入液相色谱仪,按“2.1”项下色谱条件测定,记录色谱图峰面积,以峰面积( $Y$ )对化合物质量浓度( $X, \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ )进行线性回归。标准曲线方程、线性范围及相关系数见表 2。

表 2 6 个成分的标准曲线方程、相关系数及线性范围

| 成分   | 回归方程                              | 线性范围<br>( $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) | $r$    |
|------|-----------------------------------|----------------------------------------------|--------|
| 原儿茶酸 | $Y = 3.654 \times 10^3 X + 30.12$ | 0.069~1.727                                  | 0.9998 |
| 没食子酸 | $Y = 1.64 \times 10^4 X + 15.46$  | 0.012~0.311                                  | 0.9999 |
| 槲皮素  | $Y = 9.68 \times 10^3 X - 10.36$  | 0.038~0.945                                  | 0.9998 |
| 芦丁   | $Y = 3.63 \times 10^4 X - 10.87$  | 0.031~0.780                                  | 0.9998 |
| 芹菜素  | $Y = 7.86 \times 10^2 X - 10.36$  | 0.005~0.126                                  | 0.9994 |
| 山柰酚  | $Y = 1.06 \times 10^3 X - 32.89$  | 0.008~0.208                                  | 0.9995 |

2.4.2 精密度试验 取混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次,记录色谱图峰面积,测得原儿茶酸、没食子酸、槲皮素、芦丁、芹菜素和山柰酚峰面积 *RSD* 分别为 0.21%,0.05%,0.09%,0.07%,0.15%,0.20% ( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

2.4.3 重复性试验 取同一批(编号:Y1,0 kGy)赶黄草药材,粉碎过筛(4 号筛),按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,记录色谱图峰面积,计算各组分含量及 *RSD*。结果原儿茶酸、没食子酸、槲皮素、芦丁、芹菜素和山柰酚平均含量分别为 10.882 0, 1.742 0, 5.938 0, 4.802 0, 0.788 0, 1.292 0  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , *RSD* 分别为 0.36%, 0.44%,0.31%,0.17%,0.80%,0.90% ( $n=6$ ),表明方法重复性较好。

2.4.4 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于配制后 0,3,6,9,12,18,24 h 按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图峰面积。结果原儿茶酸、没食子酸、槲皮素、芦丁、芹菜素和山柰酚面积 *RSD* 分别为 0.86%, 0.77%, 0.68%, 1.02%, 1.25%, 1.48% ( $n=7$ ),表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.5 加样回收率试验 取同一批赶黄草药材(编号:Y1,0 kGy)6 份,粉碎过筛(4 号筛),精密称取粉末约 0.5 g,置 100 ml 具塞锥形瓶中,精密加入“2.2”项下混合对照品贮备液 1.5 ml,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下进行测定,记录色谱图峰面积,计算回收率。结果原儿茶酸、没食子酸、槲皮素、芦丁、芹菜素和山柰酚的平均回收率分别为 99.9%, 99.5%, 99.9%, 99.5%, 98.6%,97.2%,*RSD* 分别为 0.12%,0.22%,0.15%,0.33%,1.40%,1.06% ( $n=6$ ),表明方法准确度较高。

2.5 赶黄草样品测定

取不同辐射剂量处理的供试品,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行检测,记录色谱图峰面积,按“2.4.1”项下标准曲线计算各组分含量。考察不同辐照强度对赶黄草中各成分含量的影响。结果见表 3。

采用 SPSS 22 统计软件对辐照前后各组分含量进行配对 *t* 检验,结果表明,当<sup>60</sup>Co- $\gamma$  射线辐照剂量 >5 kGy 时,样品 Y1、Y2、Y3、Y4、Y6 中原儿茶酸、没食子酸、槲皮素、芦丁、芹菜素和山柰酚含量较辐照前差异有统计学意义( $P<0.05$ )。辐照剂量不超过 5 kGy 时,各组分含量差异无统计学意义( $P>0.05$ )。为保证赶黄草药品质量,最佳辐照剂量以不超过为 5 kGy 为宜。

表 3 赶黄草各成分含量测定结果 ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $n=3$ )

| 编号   | 辐照强度  | 没食子酸  | 原儿茶酸   | 芦丁    | 槲皮素   | 芹菜素   | 山柰酚   |
|------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|
| Y1-1 | 0 kGy | 1.739 | 10.881 | 4.803 | 5.939 | 0.789 | 1.293 |
| Y1-2 | 2 kGy | 1.740 | 10.882 | 4.803 | 5.938 | 0.788 | 1.293 |
| Y1-3 | 5 kGy | 1.739 | 10.882 | 4.802 | 5.936 | 0.785 | 1.292 |
| Y1-4 | 8 kGy | 1.623 | 9.565  | 3.256 | 5.865 | 0.356 | 0.656 |
| Y2-1 | 0 kGy | 1.642 | 9.791  | 3.873 | 5.108 | 0.583 | 1.056 |
| Y2-2 | 2 kGy | 1.642 | 9.790  | 3.871 | 5.109 | 0.584 | 1.054 |
| Y2-3 | 5 kGy | 1.641 | 9.791  | 3.872 | 5.108 | 0.583 | 1.055 |
| Y2-4 | 8 kGy | 1.553 | 8.325  | 3.236 | 5.003 | 0.235 | 0.365 |
| Y3-1 | 0 kGy | 1.668 | 10.044 | 4.331 | 4.869 | 0.656 | 1.135 |
| Y3-2 | 2 kGy | 1.665 | 10.003 | 4.332 | 4.868 | 0.654 | 1.134 |
| Y3-3 | 5 kGy | 1.666 | 10.025 | 4.329 | 4.864 | 0.651 | 1.135 |
| Y3-4 | 8 kGy | 1.521 | 8.685  | 3.032 | 4.752 | 0.317 | 0.365 |
| Y4-1 | 0 kGy | 1.605 | 9.656  | 4.702 | 5.036 | 0.689 | 1.032 |
| Y4-2 | 2 kGy | 1.604 | 9.655  | 4.702 | 5.032 | 0.688 | 1.032 |
| Y4-3 | 5 kGy | 1.604 | 9.654  | 4.702 | 5.031 | 0.688 | 1.031 |
| Y4-4 | 8 kGy | 1.304 | 8.032  | 2.968 | 4.952 | 0.369 | 0.454 |
| Y5-1 | 0 kGy | 1.538 | 9.872  | 4.691 | 5.156 | 0.691 | 1.148 |
| Y5-2 | 2 kGy | 1.536 | 9.845  | 4.689 | 5.155 | 0.690 | 1.145 |
| Y5-3 | 5 kGy | 1.532 | 9.650  | 4.690 | 5.153 | 0.687 | 1.147 |
| Y5-4 | 8 kGy | 1.432 | 7.654  | 3.046 | 5.036 | 0.312 | 0.499 |
| Y6-1 | 0 kGy | 1.704 | 10.336 | 4.331 | 5.269 | 0.656 | 1.083 |
| Y6-2 | 2 kGy | 1.701 | 10.356 | 4.326 | 5.268 | 0.655 | 1.082 |
| Y6-3 | 5 kGy | 1.703 | 10.265 | 4.329 | 5.036 | 0.654 | 1.080 |
| Y6-4 | 8 kGy | 1.698 | 8.648  | 3.039 | 5.184 | 0.235 | 0.498 |

2.6 PLS-DA 分析

为进一步探讨<sup>60</sup>Co- $\gamma$  射线对赶黄草辐照所引起质量变化的内在因素,将表 3 数据输入 SIMCA-P 分析软件(14.1 版)进行 PLS-DA 分析。经 PLS-DA 模型分析分别生成得分图及变量重要性投影值图(VIP 图),分别见图 2、图 3。

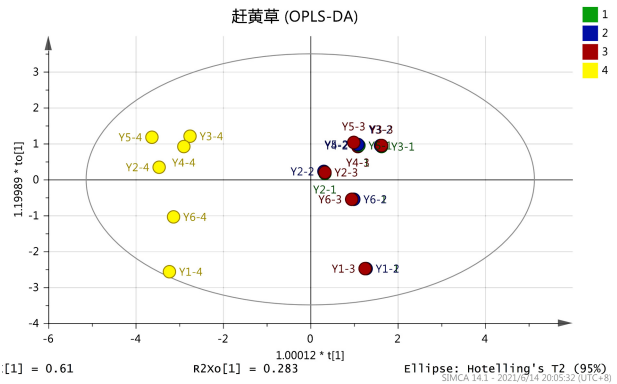


图 2 PLS-DA 得分散点图

图 2 中每一个点代表表 3 中每一个样品,点之间的聚合程度反映样品间相似度。由图 2 得分矩阵图可知,PLS-DA 模型中所有数据点均在 95%置信区间椭圆形圈内,所有数据点大体聚为两类,其中,代表经 8kGy 辐照后的样品的数据点 Y1-4、Y2-4、Y3-4、Y4-4、Y5-4、Y6-4 聚为一类,其他聚为一类,说明辐照强度超过 5kGy 时,样品的内部质量已经发

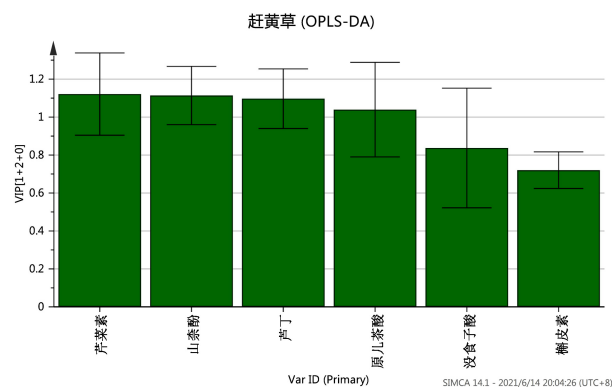


图3 PLS-DA VIP 值图

生了改变。从图3变量重要性投影值(VIP)可进一步直观看出变量(各成分)对模型分类的整体贡献度,变量VIP值>1.0说明该成分对样本分类的影响有统计学意义,可作为差异标志物,说明芹菜素、山柰酚、芦丁、原儿茶酸、没食子酸是引起不同辐照条件处理后样品质量差异的主要标志性成分。

### 3 讨论

#### 3.1 色谱条件及提取方式的优化

在考察赶黄草提取方式时,先后采用不同浓度甲醇、乙醇作为溶出介质,比较冷浸、热浸、超声、加热回流等提取方式,结果采用60%乙醇超声处理1h时,赶黄草样品中原儿茶酸、没食子酸、槲皮素、芦丁、芹菜素和山柰酚的回收率最高,方法较为简单实用,具有良好的重现性。利用DAD检测器,分别对原儿茶酸、没食子酸、槲皮素、芦丁、芹菜素和山柰酚进行光谱分析,结果各成分最大吸收峰值虽不尽相同,但在340nm处各成分均有较好吸收强度。本文分别以乙腈-0.1mol·L<sup>-1</sup>磷酸盐缓冲液、乙腈-0.1%冰醋酸水溶液和乙腈-0.05%磷酸水溶液系统作为流动相,在340nm处对供试品进行色谱分析,结果以乙腈-0.05%磷酸水溶液作为流动相时,各主峰与前后杂质峰分离度完好,主峰对称性好,强度适中。

#### 3.2 不同辐照剂量对赶黄草质量影响

从表3数据可以看出,当辐照剂量超过5kGy时,各成分含量均有不同程度的降低,其中以芹菜素和山柰酚减少的幅度最大,芹菜素属于黄酮类化合物,具有抑制致癌物质致癌活性的作用,光照及高温等条件都会影响其含量。从图2、图3可以看出,当辐照剂量大于5kGy时,<sup>60</sup>Co-γ射线对赶黄草质量产生了变化,且各成分对引起不同样本的质量差异的贡献率从大到小依次为芹菜素>山柰酚>芦丁>原儿茶酸>没食子酸>槲皮素,其中前5个成分的VIP

值>1.0,因此,在赶黄草药材评价及制定质量标准时,建议将芹菜素、山柰酚、芦丁、原儿茶酸及没食子酸作为质量考察指标。

#### 3.3 小结

本研究通过一系列实验证明,当辐照剂量不超过5kGy时,赶黄草药材质量稳定,<sup>60</sup>Co-γ射线辐照灭菌方法经济、实用、安全,可用于赶黄草药材的灭菌,为药材存贮及流通提供强有力保障。

### 参 考 文 献

- 王萌,吴霞,江云,等.赶黄草的研究进展[J].食品与药品,2013,15(3):202-204
- 中国植物志编委会.中国植物志(第二分册)[M].北京:科学出版社,1992:2
- 姚吉强.基于网络药理学的赶黄草治疗肾病综合征的作用及机制研究[D].四川泸州:西南医科大学,2020
- 余蕾,谢晓芳,彭英,等.赶黄草总黄酮对活化的肝星状细胞TGF-β1/Smads信号通路的影响[J].天然产物研究与开发,2020,32(7):1118-1123
- 钟欣,朱华,贾智慧,等.赶黄草抗炎作用及其机理研究[J].西华师范大学学报(自然科学版),2017,38(1):48-51,74
- 李杰,蒋志涛,刘晓燕,等.赶黄草药理作用及其质量标志物研究进展[J].南京中医药大学学报,2019,35(6):757-760
- 张剑,伍淑明,杨肖,等.赶黄草中化学成分研究进展[J].中草药,2017,48(21):4571-4577
- 熊亮,彭成.基于中药质量标志物(Q-Marker)的基本条件研究益母草和赶黄草的Q-Marker[J].中草药,2016,47(13):2212-2220
- 孙宗良.赶黄草活性成分的研究[D].重庆:重庆大学,2016
- 冯浩,王智民,董歌扬,等.赶黄草化学成分的研究[J].中国中药杂志,2001,26(4):44-46
- 朱立俏,张元元,于绍华,等.莱菔子炮制前后HPLC指纹图谱及主要成分含量变化研究[J].中药新药与临床药理,2018,29(5):614-621
- 闵春艳,张圆,吴杨,等.UPLC法结合PLS评价硫磺熏蒸对西洋参皂苷成分的影响[J].药物分析杂志,2018,38(3):432-442
- 邹妍,鄢海燕.基于PCA及PLS-DA算法分析决明子炒制前后化学成分的变化[J].中国医院药学杂志,2018,38(19):2027-2030
- 韩振明,关永霞,张微,等.<sup>60</sup>Co-γ射线辐照灭菌对蜈蚣药粉品质的影响研究[J].中国药业,2021,30(9):42-45
- 吴珂,赵冠人,陈明,等.<sup>60</sup>Co-γ射线辐射对异烟肼稳定性的影响[J].中国药师,2017,20(11):2064-2066
- 张乐佳,李黎明,宋军,等.<sup>60</sup>Co-γ射线辐照灭菌对鸡内金生药粉质量影响的研究[J].中南药学,2020,18(9):1546-1550
- 黄义雯,朱芹.<sup>60</sup>Co-γ射线辐照灭菌对沉香化气胶囊中6个挥发性成分的影响[J].药物分析杂志,2020,40(2):352-359
- 程建安,俞圆,董宇.HPLC法测定赶黄草中7种化学成分的含量[J].中药材,2019,42(12):2878-2881

(2021-07-06 收稿 2021-11-06 修回)