



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107320699 A

(43)申请公布日 2017. 11. 07

(21)申请号 201710523887.6

A61K 9/06(2006.01)

(22)申请日 2017.06.30

A61P 29/00(2006.01)

(71)申请人 中国中医科学院中药研究所

地址 100700 北京市东城区东直门内南小街16号

申请人 安徽安科余良卿药业有限公司

(72)发明人 刘淑芝 何爱萍 刘道芳 易红  
梁日欣 杜茂波 冯伟红 刘海兵  
姚瑶 柏金金 徐莉莉

(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

代理人 程伟 刘彬娜

(51)Int.Cl.

A61K 36/9068(2006.01)

A61K 9/107(2006.01)

权利要求书2页 说明书16页 附图3页

(54)发明名称

一种中药复方微乳凝胶剂及其制备方法和用途

(57)摘要

本发明涉及一种中药复方微乳凝胶剂及其制备方法和用途。特别地,本发明涉及一种微乳凝胶组合物,其含有水杨酸甲酯、薄荷脑、樟脑、冰片及含丹皮酚、丁香酚、胡椒碱等活性成分的中药提取物,和微乳凝胶基质,其中所述活性成分包载于微乳中。本发明进一步涉及该微乳凝胶组合物的制备方法,及其在活血止痛中的用途。本发明制剂不仅保证了药物与基质的高度融合,同时具有载药量高,对皮肤刺激性小,透皮吸收性能好,制备工艺简单等特点。

1. 一种微乳凝胶组合物,其含有24种中药材提取物和四种原料药作为有效物质和微乳凝胶基质,所述24种中药材提取物为干姜、山奈、白芷、甘松、大黄、生天南星、生半夏、没药、乳香、陈皮、当归、丁香、胡椒、香加皮、细辛、荆芥、桂枝、辛夷、川芎、独活、牡丹皮、辣椒和苍术的提取物,以及颠茄流浸膏;所述四种原料药为水杨酸甲酯、薄荷脑、樟脑、冰片;其中所述有效物质包载于微乳中。

2. 根据权利要求1所述的微乳凝胶组合物,其中所述包载有效物质的微乳为O/W型微乳。

3. 根据权利要求1或2所述的微乳凝胶组合物,其中所述有效物质含有丹皮酚、丁香酚、胡椒碱作为活性成分。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的微乳凝胶组合物,其中所述的微乳基质由表面活性剂、助表面活性剂、油相和水相组成。

5. 根据权利要求4所述的微乳凝胶组合物,其中所述油相为处方中的水杨酸甲酯溶解冰片、樟脑和薄荷脑所得的混合物作为油相。

6. 根据权利要求4或5所述的微乳凝胶组合物,其中所述表面活性剂选自吐温、司盘、聚氧乙烯氢化蓖麻油、辛酸\癸酸聚乙二醇甘油酯的一种或两种以上的混合物,优选吐温80、吐温20、司盘80、司盘60、聚氧乙烯氢化蓖麻油RH40、辛酸\癸酸聚乙二醇甘油酯。

7. 根据权利要求4至6中任一项所述的微乳凝胶组合物,其中所述助表面活性剂选自无水乙醇、甘油、丙二醇、聚乙二醇-400的一种或两种以上的混合物。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的微乳凝胶组合物,其中所述凝胶基质为亲水性凝胶基质,优选卡波姆、羧甲基纤维素钠、羟丙甲纤维素、聚丙烯酸钠、海藻酸钠、阿拉伯胶、西黄蓍胶、聚乙烯醇的一种或两种以上的混合物。

9. 根据权利要求4至8中任一项所述的微乳凝胶组合物,其中,以组合物的总重量计,所述油相的重量百分比为0.1%~10%之间,优选0.5%至5%,并且以油相的总重量计,水杨酸甲酯的重量百分比为33.1%,冰片、樟脑和薄荷脑的重量百分比分别为22.3%。

10. 根据权利要求4至9中任一项所述的微乳凝胶组合物,其中,以组合物的总重量计,所述表面活性剂的重量百分比在1%~30%之间,优选9%至30%之间。

11. 根据权利要求4至10中任一项所述的微乳凝胶组合物,其中,以组合物的总重量计,所述助表面活性剂的重量百分比在0%~20%之间,优选3%至15%之间。

12. 根据权利要求4至11中任一项所述的微乳凝胶组合物,其中,以组合物的总重量计,所述凝胶基质的重量百分比在0.3%~10%之间,优选1%~3%之间。

13. 根据权利要求1至12中任一项所述的微乳凝胶组合物,其中,以组合物的总重量计,所述中药材提取物的重量百分比在0.5%~20%之间,优选0.8%~12%之间。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的微乳凝胶组合物,其进一步含有保湿剂、防腐剂、抗氧化剂,所述保湿剂优选甘油、山梨醇、丙二醇、聚乙二醇的一种或两种以上的混合物,所述防腐剂优选羟苯乙酯、山梨酸钾、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲醇的一种或两种以上的混合物。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的微乳凝胶组合物,其中,包载有活性成分的微乳的平均粒径在20~50nm之间,多分散系数PDI在0.3以下。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的微乳凝胶组合物,其中,微乳凝胶的平均粒径

在20~50nm之间,多分散系数PDI在0.4以下。

17. 根据权利要求1至16中任一项所述的微乳凝胶组合物的制备方法,其包括以下步骤:

1) 称取处方中薄荷脑、樟脑、冰片研磨使其部分液化,再加入水杨酸甲酯混合使溶解,作为油相备用;

2) 称取处方量的中药材制得中药浸膏;

3) 将步骤1中制得的油相与浸膏、表面活性剂、助表面活性剂和任选的防腐剂于20~35℃搅拌,至药物溶解完全后,缓慢加入水,搅拌均匀,即得活血止痛微乳;或者

称取油相、表面活性剂、助表面活性剂和任选的防腐剂于20~35℃搅拌,缓慢加入水,搅拌均匀,即得空白微乳;然后将步骤2)中制得的浸膏加入至空白微乳中,搅拌均匀,即得活血止痛微乳;

4) 称取凝胶基质和任选的抗氧化剂,加适量水,于20~35℃充分溶胀,加入步骤3)中制得的活血止痛微乳搅拌均匀,调节pH至6~7,即得本发明活血止痛微乳凝胶剂。

18. 根据权利要求1至16中任一项所述的微乳凝胶组合物在制备用于活血止痛的药物中的用途。

19. 根据权利要求1至16中任一项所述的微乳凝胶组合物在制备用于筋骨疼痛、肌肉麻痹、痰核流注、关节酸痛的药物中的用途。

## 一种中药复方微乳凝胶剂及其制备方法和用途

### 技术领域

[0001] 本发明提供一种新型的微乳凝胶制剂及其制备方法和在医药中的用途。

### 背景技术

[0002] 活血止痛膏处方来源于清康熙七年间的“宝珍膏”，由安徽安科余良卿药业有限公司自主研制与生产，1965年改为橡胶膏剂型，至今已有50多年的销售历史。活血止痛膏于2010年收载入《中国药典》一部，记载其具有活血止痛、舒筋通络之功效，用于筋骨疼痛，肌肉麻痹，痰核流注，关节酸痛。由于疗效确切，上市以来受到患者广泛认可，年单品种超亿元。

[0003] 活血止痛膏的处方药材主要包括干姜、山奈、白芷、甘松、大黄、生天南星、生半夏、没药、乳香、冰片、薄荷脑、樟脑、陈皮、当归、丁香、胡椒、香加皮、细辛、荆芥、桂枝、辛夷、川芎、独活、牡丹皮、辣椒、苍术、颠茄流浸膏、水杨酸甲酯。现有技术中，活血止痛膏的制备步骤如下：以上二十八味药，除薄荷脑、冰片、水杨酸甲酯、颠茄流浸膏、樟脑外，其余白芷等二十三味粉碎成粗粉，用90%乙醇作为溶剂，浸渍，渗漉，收集渗滤液，回收乙醇并浓缩成相对密度约为1.05(80℃)的清膏，加入上述薄荷脑等五味，搅匀，另加4.5~5倍重量由橡胶、松香等制成的基质，制成涂料，进行涂膏，切断，盖衬，切片，即得。

[0004] 活血止痛浸膏原料药由两部分组成，一部分是干姜、丁香、牡丹皮、胡椒、甘松等23味中药材提取物及颠茄流浸膏混合所得的中药提取物浸膏，另一部分是樟脑、薄荷脑、冰片、水杨酸甲酯4种易挥发的原料药。中药提取物浸膏中选择有效成分丹皮酚和丁香酚作为代表性成分，4种原料药中选择水杨酸甲酯作为代表性成分。以这三种成分的含量作为考察指标。

[0005] 虽然活血止痛膏疗效显著，但也有不足之处：

[0006] 1、不良反应方面

[0007] 目前，橡胶膏剂中存在致敏因素，其变态、刺激、剥离反应降低了其用药舒适性、安全性和有效性。橡胶膏剂由裱褙材料、膏料、膏面覆盖物三部分组成，分析发现中药橡胶膏剂的过敏性问题与这些物质密切相关。其中，裱褙材料常用棉布、化纤布、弹性布，透气性差，当皮肤表面贴附不透气的膏剂时，皮肤大量的排泄物堆积在皮肤表层，对皮肤产生刺激，从而形成局部红肿、红斑、红疹、瘙痒等过敏症状。膏料中的橡胶基质包括橡胶、增粘剂、软化剂、填充剂等多种物质，天然橡胶中的蛋白质，增粘剂松香中的松香酸均易引起皮肤的过敏反应，填充剂氧化锌质量优劣直接影响橡胶膏剂的剥离强度，在剥离过程中易牵拉皮肤，引起皮肤潮红、发热、甚至过敏。

[0008] 2、制备工艺方面

[0009] 活血止痛膏中含有大量具有挥发性的有效成分，如水杨酸甲酯、冰片、樟脑、薄荷脑等，约占制剂最后加入药物(干重)的50%。然而，橡胶膏剂的传统制备方法主要有溶剂法和热压法两种，均需要在较高的温度下完成，必定会造成有效成分的损失，影响药效。且溶剂法大量消耗能源资源，生产过程安全隐患大，汽油极易燃烧，烘干过程汽油大量挥发对环

境造成污染,也不利于生产工人的劳动保护;热压法制备的橡胶膏剂具有膏面不光亮,持粘性弱,贴后皮肤有残留物等缺点。

[0010] 为了克服现有技术的不足,本发明将活血止痛橡胶膏剂改剂型为活血止痛微乳凝胶剂。一方面,巧妙利用薄荷脑、樟脑、冰片三者混合产生的部分液化现象,再用油状水杨酸甲酯溶解制备成油相,加入其它辅料制备成微乳,将含28味中药的复方纳米化,促进药物透皮吸收性能,另一方面,具有刺激性小,载药量高,药物与基质融合性好等特点。目前,微乳粘度低,流动性强,作为经皮给药载体粘附性较差,而凝胶具有良好的粘附性,亲水性凝胶手感好,质地均匀细腻,易涂布,易洗除,不污染衣物,对皮肤和黏膜刺激性小,制成微乳凝胶,以起到优势互补的作用。

## 发明内容

[0011] 本发明旨在提供一种微乳凝胶组合物,其含有24种中药材提取物和四种原料药作为有效物质和微乳凝胶基质,所述24种中药材提取物为干姜、山奈、白芷、甘松、大黄、生天南星、生半夏、没药、乳香、陈皮、当归、丁香、胡椒、香加皮、细辛、荆芥、桂枝、辛夷、川芎、独活、牡丹皮、辣椒和苍术的提取物,以及颠茄流浸膏;所述四种原料药为水杨酸甲酯、薄荷脑、樟脑、冰片;其中所述有效物质包载于微乳中。

[0012] 角质层细胞是由脂质双分子层组成,是药物透皮吸收的限速因素,药物透过角质层主要有不经细胞和经细胞两种途径。而微乳同时具有亲水区和亲脂区,经皮给药的微乳一旦进入角质层,能同时改变极性和脂性途径,其亲水区能使角质层很大程度的发生水合作用,当微乳的水相流入极性区,它将增加角质层脂质双分子层的膜内体积,一些脂链同角质层蛋白使共价键疏散,导致界面结构的破坏,这些蛋白质的水化将导致脂质双层的破坏,能促进药物的吸收;亲脂区能以许多种方式同角质层相互作用,溶解在微乳脂性区的药物能直接分配进角质层的脂质中,或脂质载体本身能插入角质层的脂质区,因而破坏它的双分子层结构,这些相互作用能导致增加药物的渗透。微乳系统中所用的低级醇类能提高皮肤的通透性,促进载药系统的整体经皮运转,微乳贮藏皮内,发挥贮库作用,使药物缓慢释放,发挥长效作用。微乳粒径一般为10~100nm,粒子大小也能影响药物渗透作用。当粒子较小时,载体和角质层相互作用的机会就增加,因此药物透皮吸收增加。另外,粒子较大时,不仅相互作用的机会减少,并且载体透过皮肤比较困难。

[0013] 微乳是油相、水相、表面活性剂及助表面活性剂按一定比例混合,自发形成的一种透明或半透明、低粘度、热力学稳定且各向同性的油水混合系统。

[0014] 微乳凝胶剂是将微乳液加入至凝胶基质(如天然高分子聚合物、纤维素衍生物、嵌段聚合物等高分子材料)中,形成的透明、均质、稳定的凝胶网状结构,网状结构中含有微乳液滴。

[0015] 在本发明的一个具体实施方案中,根据本发明所述的微乳凝胶组合物,其中所述包载有活性成分的微乳为O/W型微乳。

[0016] 按照油相、水、表面活性剂和助表面活性剂的组成、比例不同将微乳分为三种基本结构类型,即O/W、W/O和B.C型。

[0017] 在本发明的另一具体实施方案中,根据本发明所述的微乳凝胶组合物,其中所述的微乳基质由表面活性剂、助表面活性剂和油相组成。

[0018] 在本发明一个优选的实施方案中,根据本发明所述的微乳凝胶组合物,其中所述油相为药物中的组分水杨酸甲酯溶解冰片、樟脑和薄荷脑所得的混合油相。

[0019] 在本发明另一个优选的实施方案中,根据本发明所述的微乳凝胶组合物,其中所述表面活性剂选自吐温、司盘、聚氧乙烯氢化蓖麻油、辛酸\癸酸聚乙二醇甘油酯的一种或两种以上的混合物,优选吐温80、吐温20、司盘80、司盘60、聚氧乙烯氢化蓖麻油(RH40)、辛酸\癸酸聚乙二醇甘油酯,更优选吐温80、吐温20、聚氧乙烯氢化蓖麻油(RH40)。

[0020] 在本发明另一个优选的实施方案中,根据本发明所述的微乳凝胶组合物,其中所述助表面活性剂选自无水乙醇、甘油、丙二醇、聚乙二醇-400(PEG400)的一种或两种及以上的混合物。

[0021] 在本发明另一个优选的实施方案中,根据本发明所述的微乳凝胶组合物,其中所述凝胶基质为亲水性凝胶基质,优选卡波姆(CP)、羧甲基纤维素钠(CMC-Na)、羟丙甲纤维素(HPMC)、聚丙烯酸钠、海藻酸钠、阿拉伯胶、西黄蓍胶、聚乙烯醇的一种或两种以上的混合物。

[0022] 在本发明一个优选的实施方案中,根据本发明所述的微乳凝胶组合物,其中,以组合物的总重量计,所述油相的重量百分比为0.1%~10%之间,优选0.5%至5%,并且以油相的总重量计,水杨酸甲酯的重量百分比为33.1%,冰片、樟脑和薄荷脑的重量百分比分别为22.3%。

[0023] 在本发明另一个优选的实施方案中,根据本发明所述的微乳凝胶组合物,其中,以组合物的总重量计,所述表面活性剂的重量百分比在1%~30%之间,优选9%至30%之间。

[0024] 在本发明另一个优选的实施方案中,根据本发明所述的微乳凝胶组合物,其中,以组合物的总重量计,所述助表面活性剂的重量百分比在0%~20%之间,优选3%至15%之间。

[0025] 在本发明另一个优选的实施方案中,根据本发明所述的微乳凝胶组合物,其中,以组合物的总重量计,所述凝胶基质的重量百分比在0.3%~10%之间,优选1%~3%之间。

[0026] 在本发明另一个优选的实施方案中,根据本发明所述的微乳凝胶组合物,其中,以组合物的总重量计,所述中药提取物的重量百分比在0.5%~20%之间,优选0.8%~12%之间。

[0027] 在本发明另一个优选的实施方案中,根据本发明所述的微乳凝胶组合物,其进一步含有保湿剂、防腐剂、抗氧化剂,所述保湿剂优选甘油、山梨醇、丙二醇、聚乙二醇的一种或两种以上的混合物,所述防腐剂优选羟苯乙酯、山梨酸钾、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲醇的一种或两种及以上的混合物。

[0028] 在本发明另一个优选的实施方案中,根据本发明所述的微乳凝胶组合物,其中,包载有活性成分的微乳的平均粒径在20~50nm之间,多分散系数PDI在0.3以下。

[0029] 在本发明另一个优选的实施方案中,根据本发明所述的微乳凝胶组合物,其中,微乳凝胶的平均粒径在20~50nm之间,多分散系数PDI在0.4以下。

[0030] 本发明进一步提供一种根据本发明所述的微乳凝胶组合物的制备方法,其包括以下步骤:

[0031] 1)称取处方中薄荷脑、樟脑、冰片研磨使其部分液化,再加入水杨酸甲酯混合使溶解,作为油相备用;

[0032] 2) 称取处方量的中药材制得中药浸膏;

[0033] 3) 将步骤1中制得的油相与浸膏、表面活性剂、助表面活性剂和任选的防腐剂于20~35℃搅拌,至药物溶解完全后,缓慢加入水,搅拌均匀,即得活血止痛微乳;或者

[0034] 称取油相、表面活性剂、助表面活性剂和任选的防腐剂于20~35℃搅拌,缓慢加入水,搅拌均匀,即得空白微乳;然后将步骤2)中制得的浸膏加入至空白微乳中,搅拌均匀,即得活血止痛微乳;

[0035] 4) 称取凝胶基质和任选的抗氧剂,加适量水,于20~35℃充分溶胀,加入步骤3)中制得的活血止痛微乳搅拌均匀,调节pH至6~7,即得本发明活血止痛微乳凝胶剂。

[0036] 本发明另一方面提供根据本发明所述的微乳凝胶组合物在制备用于活血止痛的药物中的用途。

[0037] 本发明进一步提供根据本发明所述的微乳凝胶组合物在制备用于筋骨疼痛、肌肉麻痹、痰核流注、关节酸痛的药物中的用途。

[0038] 在本发明进一步优选的实施方案中,本发明提供一种微乳凝胶组合物,其含有活性成分提取物、由油相、表面活性剂和助表面活性剂构成的微乳、亲水性凝胶基质、保湿剂、防腐剂、抗氧剂和适量的水。以组合物的总重量计,各组分的重量百分比如下表1所示。

[0039] 表1

	组分	百分含量
	中药提取物浸膏	1%~20%
	混合油相	0.5%~10%
	表面活性剂	1%~30%
	助表面活性剂	0%~20%
[0040]	亲水性凝胶基质	0.3%~10%
	保湿剂	0%~10%
	防腐剂	0%~0.5%
	抗氧剂	0%~0.5%
	水	适量

[0041] 其中,表面活性剂包括但不限于吐温80、吐温20、司盘80、司盘60、聚氧乙烯氢化蓖麻油(RH40)、辛酸\癸酸聚乙二醇甘油酯(Labrasol)的一种或两种及以上的混合物。助表面活性剂包括但不限于无水乙醇、甘油、丙二醇、聚乙二醇-400(PEG400)的一种或两种及以上的混合物。亲水性凝胶基质包括但不限于卡波姆(CP)、羧甲基纤维素钠(CMC-Na)、羟丙甲纤维素(HPMC)、聚丙烯酸钠、海藻酸钠、阿拉伯胶、西黄蓍胶、聚乙烯醇的一种或两种及以上的混合物。保湿剂包括但不限于甘油、山梨醇、丙二醇、聚乙二醇的一种或两种及以上的混合物。防腐剂包括但不限于羟苯乙酯、山梨酸钾、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲醇的一种或两种及以上的混合物。

[0042] 本发明微乳凝胶组合物的具体制备方法如下:

[0043] (1) 混合油相的制备

[0044] 按处方水杨酸甲酯:樟脑:薄荷脑:冰片(1.5:1:1:1)的比例称取药物,先取樟脑、薄荷脑和冰片混合研至部分液化,再加入水杨酸甲酯搅拌使完全溶解,作为混合油相。

[0045] (2)活血止痛微乳的制备

[0046] 方法一:称取处方量的混合油相、中药提取物浸膏、表面活性剂、助表面活性剂、防腐剂于20~35℃条件下搅拌40分钟,搅拌速度300-500转/分钟,至药物溶解完全后,缓慢加入水,搅拌平衡20分钟,即得活血止痛微乳。

[0047] 方法二:称取处方量的混合油相、表面活性剂、助表面活性剂、防腐剂于20~35℃条件下搅拌10分钟,搅拌速度300-500转/分钟,缓慢加入水,搅拌平衡10分钟,再加入处方量的中药提取物浸膏、混合均匀,搅拌平衡30分钟,即得活血止痛微乳。

[0048] (3)活血止痛微乳凝胶剂的制备

[0049] 方法一:称取处方量亲水性凝胶基质、抗氧剂,加适量水,于20~35℃过夜充分溶胀,加活血止痛微乳搅拌均匀,搅拌速度150~350转/分钟,调节pH至6~7,即得活血止痛微乳凝胶剂。

[0050] 方法二:称取处方量亲水性凝胶基质、抗氧剂,加活血止痛微乳,于20~35℃条件下过夜充分溶胀,搅拌均匀,搅拌速度150~350转/分钟,调节pH至6~7,即得活血止痛微乳凝胶剂。

[0051] 本发明的优点:

[0052] 1) 本发明的活血止痛微乳凝胶剂所用的辅料均为药物制剂中的常规辅料,在用药安全性上具有明显优势,可减少活血止痛膏基质对皮肤的过敏反应,且保湿效果好,能提高患者的顺应性;

[0053] 2) 本发明的活血止痛微乳凝胶剂可将活血止痛浸膏纳米化,且载药量高,有利于药物的释放和透皮吸收,增强药物的治疗效果;

[0054] 3) 活血止痛浸膏使用90%醇提取,含有大量脂溶性强的有效成分,由此可将其转化为O/W型微乳,与亲水性凝胶结合,相容性好,能增加制剂的稳定性;

[0055] 4) 本发明的活血止痛微乳凝胶剂制备工艺简单易操作,无需加热保温等条件控制,能增加药物中挥发性有效成分的稳定性。

## 附图说明

[0056] 图1为实施例6中得到的活血止痛微乳的粒径分布图。

[0057] 图2为实施例6中得到的活血止痛微乳的电镜扫描图。

[0058] 图3为实施例6中制得的活血止痛微乳凝胶剂的粒径分布图。

[0059] 图4和图5为实施例6中制得的活血止痛微乳凝胶剂的电镜扫描图。

[0060] 图6为实施例6中制得的活血止痛微乳凝胶剂的流变类型曲线。

[0061] 图7为实施例6中制得的活血止痛微乳凝胶剂的累积透过曲线图。

## 具体实施方式

[0062] 以下通过具体实施例进一步描述本发明,但应理解这些实施例仅是为了阐明本发明,并不以任何形式限制本发明的范围。

[0063] 实验材料



[0064] 樟脑(批号HY-029-1510004),薄荷脑(批号ZY-124-1511005),冰片(批号ZY-040-1510002),水杨酸甲酯(批号HY-004-1511009),颠茄流浸膏(批号ZY-122-1511004),均购自安徽安科余良卿药业有限公司。

[0065] 中链甘油三酸酯(MCT,101091109,建德市千岛精细化工实业有限公司);聚氧乙烯氢化蓖麻油(RH40,01932368E0,德国BASF);聚山梨酯80(Tween80,20120501,湖南华日制药有限公司);聚山梨酯20(Tween20,20121010,国药集团化学试剂有限公司);聚乙二醇-400(PEG400,13/34,德国Sasol);甘油(20140739,浙江遂昌惠康药业有限公司);卡波姆940(美国诺誉公司);山梨酸钾(陕西西岳制药有限公司);依地酸二钠(成都华邑药用辅料制造有限公司);羧甲基纤维素钠(安徽山河药用辅料股份有限公司);羟苯乙酯(103620140101,湖南尔康制药股份有限公司);聚丙烯酸钠(昭和电工株式会社);山梨醇(石家庄瑞雪制药有限公司);对羟基苯甲酸丙酯(广州汉普医药有限公司);PVA(路博润先进材料公司)丙二醇(20140705,南京威尔);无水乙醇(150901,四川金山制药有限公司);扶他林软膏(北京诺华制药有限公司,批号:X4407);甲醇(色谱纯,20140315001,天津赛孚瑞科技有限公司);娃哈哈纯净水(20150703,天津娃哈哈食品有限公司)。

[0066] 动物:昆明种小鼠90只,雄性,体重19-21g、6-7周龄。购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心,许可证号:SCXK(军)2012-0004。

[0067] 实验仪器

[0068] Anton MCR102型流变仪(奥地利安东帕公司);BSA223S-CW型电子分析天平(德国赛多利斯公司);磁力搅拌器(德国,IKA公司);Zetasizer Nano ZS纳米粒度仪(英国马尔文公司);Franz扩散池(上海锴凯有限公司);透析膜(北京京科宏达生物技术有限公司);T6新世纪紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);DELTA 320 pH计(METTLER TOLEDO);SB25-12D型超声仪(宁波新芝生物科技股份有限公司);HC-2518型高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);C-MAG HS4型磁力搅拌器(德国IKA公司);H-7650型透射电子显微镜(日本日立);JEM-2200FS型三维透射电镜(日本电子株式会社)。

[0069] 实施例1活血止痛浸膏的制备

[0070] 活血止痛膏(橡胶膏)已纳入药典(2010版一部957页、2015版一部1294页),其处方和浸膏制法如下:

	<b>【处方】</b>	干姜 28.6g	山奈 16.1g
		白芷 16.1g	甘松 14.3g
		大黄 14.3g	生天南星 9g
		生半夏 14.3g	没药 3.6g
		乳香 3.6g	冰片 7.2g
		薄荷脑 7.2g	樟脑 7.2g
[0071]		陈皮 16.1g	当归 9g
		丁香 9g	胡椒 9g
		香加皮 7.2g	细辛 7.2g
		荆芥 7.2g	桂枝 7.2g
		辛夷 5.4g	川芎 5.4g
		独活 5.4g	牡丹皮 3.6g
		辣椒 3.6g	苍术 3.6g
		颠茄流浸膏 10.7g	水杨酸甲酯 10.7g

[0072] 除上述处方中薄荷脑、冰片、樟脑、水杨酸甲酯、颠茄流浸膏外,其余白芷等二十三味药材粉碎成粗粉,用90%乙醇作为溶剂,浸渍,渗漉,收集渗漉液,回收乙醇并浓缩成相对密度为1.2634(25℃)的清膏,加入颠茄流浸膏,搅匀,即得中药提取物浸膏。上述薄荷脑、冰片、樟脑、水杨酸甲酯、薄荷脑备用。

[0073] 实施例2本发明活血止痛微乳凝胶剂的制备例一

[0074] 处方1(按100克计)

	组分	质量 (g)
	中药提取物浸膏	1.75
	混合油相	1.15
	RH40	9.00
	PEG400	4.63
[0075]	卡波姆	1.00
	丙二醇	2.50
	山梨酸钾	0.075
	依地酸二钠	0.05
	水	适量

[0076] 按照实施例1的处方称取薄荷脑、冰片、樟脑、水杨酸甲酯,先取樟脑、薄荷脑和冰片混合研至部分液化,再加入水杨酸甲酯搅拌使完全溶解,作为混合油相。

[0077] 称取混合油相1.15g、RH40 9.30g、PEG400 4.63g、山梨酸钾0.075g于20~35℃条件下搅拌10分钟,搅拌速度300-500转/分钟,缓慢加入水,搅拌平衡10分钟,加入实施例1中制得的中药提取物浸膏1.75g,搅拌平衡30分钟,即得活血止痛微乳。

[0078] 再称取卡波姆1.00g、依地酸二钠0.05g,加适量水,于20~35℃过夜充分溶胀,加

入如上制得的活血止痛微乳、丙二醇2.50g,搅拌均匀,搅拌速度150~350转/分钟,用三乙醇胺调节pH至6~7,即得本发明活血止痛微乳凝胶剂。

[0079] 实施例3本发明活血止痛微乳凝胶剂的制备例二

[0080] 处方2(按100克计)

	组分	质量(g)
	中药提取物浸膏	3.50
	混合油相	2.30
	吐温 80	13.88
[0081]	无水乙醇	4.62
	CMC-Na	2.50
	丙二醇	5.00
	羟苯乙酯	0.00
	依地酸二钠	0.10
	水	适量

[0082] 按照实施例1的处方称取薄荷脑、冰片、樟脑、水杨酸甲酯,先取樟脑、薄荷脑和冰片混合研至部分液化,再加入水杨酸甲酯搅拌使完全溶解,作为混合油相。

[0083] 称取实施例1中制得的中药提取物浸膏3.50g、混合油相2.30g、吐温80 13.88g、无水乙醇4.62g,于20~35℃搅拌40分钟,搅拌速度300~500转/分钟,至药物溶解完全后,缓慢加入适量水,搅拌平衡20分钟,得活血止痛微乳。

[0084] 再称取CMC-Na 2.50g、依地酸二钠0.10g,加入如上制得的活血止痛微乳,于20~35℃过夜充分溶胀,加入丙二醇5.00g,搅拌均匀,搅拌速度150~350转/分钟,用三乙醇胺调节pH至6~7,即得本发明活血止痛微乳凝胶剂。

[0085] 实施例4本发明活血止痛微乳凝胶剂的制备例三

[0086] 处方3(按100克计)

	组分	质量(g)
	中药提取物浸膏	5.57
	混合油相	3.68
[0087]	RH40	18.5
	丙二醇	9.25
	聚丙烯酸钠	2.00
	甘油	0.00
	山梨酸钾	0.10
[0088]	依地酸二钠	0.00
	水	适量

[0089] 按照实施例1的处方称取薄荷脑、冰片、樟脑、水杨酸甲酯,先取樟脑、薄荷脑和冰片混合研至部分液化,再加入水杨酸甲酯搅拌使完全溶解,作为混合油相。

[0090] 称取实施例1制得的中药提取物浸膏5.57g、混合油相3.68g、RH40 18.5g、丙二醇9.25g、山梨酸钾0.10g,于20~35℃搅拌40分钟,搅拌速度300-500转/分钟,至药物溶解完全后,缓慢加入适量水,搅拌平衡20分钟,得活血止痛微乳。

[0091] 再称取聚丙烯酸钠2.00g,加适量水,于20~35℃过夜充分溶胀,加入如上制得的活血止痛微乳搅拌均匀,搅拌速度150~350转/分钟,用三乙醇胺调节pH至6~7,即得本发明活血止痛微乳凝胶剂。

[0092] 实施例5本发明活血止痛微乳凝胶剂的制备例四

[0093] 处方4(按100克计)

	组分	质量(g)
	中药提取物浸膏	5.57
	混合油相	3.68
	吐温 20	13.88
	丙二醇	6.94
[0094]	聚丙烯酸钠	0.5
	山梨醇	2.50
	对羟基苯甲酸丙酯	0.5
	依地酸二钠	0.2
	水	适量

[0095] 按照实施例1的处方称取薄荷脑、冰片、樟脑、水杨酸甲酯,先取樟脑、薄荷脑和冰片混合研至部分液化,再加入水杨酸甲酯搅拌使完全溶解,作为混合油相。

[0096] 称取实施例1制得的中药提取物浸膏5.57g、混合油相3.68g、吐温20 13.88g、丙二醇6.94g、对羟基苯甲酸丙酯0.5g,于20~35℃搅拌40分钟,搅拌速度300-500转/分钟,至药物溶解完全后,缓慢加入适量水,搅拌平衡20分钟,得活血止痛微乳。

[0097] 再称取聚丙烯酸钠0.5g,依地酸二钠0.2g,加入如上制得的活血止痛微乳,于20~35℃过夜充分溶胀,加入山梨醇2.50g,搅拌均匀,搅拌速度150~350转/分钟,用三乙醇胺调节pH至6~7,即得本发明活血止痛微乳凝胶剂。

[0098] 实施例6本发明活血止痛微乳凝胶剂的制备例五

[0099] 处方5(按100克计)

组分	质量 (g)
中药提取物浸膏	3.50
混合油相	2.30
RH40	9.30
丙二醇	4.63
[0100] CMC-Na	2.50
甘油	5.00
对羟基苯甲酸丙酯	0.075
依地酸二钠	0.05
水	适量

[0101] 按照实施例1的处方称取薄荷脑、冰片、樟脑、水杨酸甲酯,先取樟脑、薄荷脑和冰片混合研至部分液化,再加入水杨酸甲酯搅拌使完全溶解,作为混合油相。

[0102] 称取实施例1制得的中药提取物浸膏3.50g、混合油相2.30g、RH40 9.30g、丙二醇4.63g、对羟基苯甲酸丙酯0.075g,于20~35℃搅拌40分钟,搅拌速度300-500转/分钟,至药物溶解完全后,缓慢加入适量水,搅拌平衡20分钟,得活血止痛微乳。

[0103] 称取CMC-Na 2.50g、依地酸二钠0.05g,加适量水,于20~35℃过夜充分溶胀,加入如上制得的活血止痛微乳、甘油5.00g,搅拌均匀,搅拌速度150~350转/分钟,用三乙醇胺调节pH至6~7,即得本发明活血止痛微乳凝胶剂。

[0104] 实施例7本发明活血止痛微乳凝胶剂的制备例六

[0105] 处方6(按100克计)

组分	质量 (g)
中药提取物浸膏	0.87
混合油相	0.50
吐温 80	6.48
无水乙醇	3.00
[0106] 卡波姆	1.00
山梨醇	7.00
羟苯乙酯	0.4
依地酸二钠	0.5
水	适量

[0107] 按照实施例1的处方称取薄荷脑、冰片、樟脑、水杨酸甲酯,先取樟脑、薄荷脑和冰片混合研至部分液化,再加入水杨酸甲酯搅拌使完全溶解,作为混合油相。

[0108] 称取混合油相0.58g、吐温80 6.48g、无水乙醇3.24g、羟苯乙酯0.4g,于20~35℃搅拌10分钟,搅拌速度300-500转/分钟,缓慢加入水,搅拌平衡10分钟。加入实施例1制得的

中药提取物浸膏0.87g,搅拌平衡30分钟,即得活血止痛微乳。

[0109] 再称取卡波姆1.00g、依地酸二钠0.5g,加入如上制得的活血止痛微乳,于20~35℃过夜充分溶胀,加入山梨醇7.00g,搅拌均匀,搅拌速度150~350转/分钟,用三乙醇胺调节pH至6~7,即得本发明活血止痛微乳凝胶剂。

[0110] 实施例8本发明活血止痛微乳凝胶剂的制备例七

[0111] 处方7(按100克计)

	组分	质量(g)
	中药提取物浸膏	2.79
[0112]	混合油相	1.84
	RH40	18.5
	PEG400	9.25
	CMC-Na	3.00
	PVA	5.00
	甘油	1.00
[0113]	山梨酸钾	0.05
	依地酸二钠	0.05
	水	适量

[0114] 按照实施例1的处方称取薄荷脑、冰片、樟脑、水杨酸甲酯,先取樟脑、薄荷脑和冰片混合研至部分液化,再加入水杨酸甲酯搅拌使完全溶解,作为混合油相。

[0115] 称取实施例1制得的中药提取物浸膏2.79g、混合油相1.84g、RH40 18.5g、PEG400 9.25g、山梨酸钾0.05g,于20~35℃搅拌40分钟,搅拌速度300~500转/分钟,至药物溶解完全后,缓慢加入适量水,搅拌平衡20分钟,得活血止痛微乳。

[0116] 再称取CMC-Na 3.00g、依地酸二钠0.05g,加入如上制得的活血止痛微乳,于20~35℃过夜充分溶胀。另取PVA5.00g于适量水中加热溶胀,冷却后,与如上制得的CMC-Na凝胶混合,加入甘油1.00g,搅拌均匀,搅拌速度150~350转/分钟,用三乙醇胺调节pH至6~7,即得本发明活血止痛微乳凝胶剂。

[0117] 实施例9本发明活血止痛微乳凝胶剂的制备例八

[0118] 处方8(按100克计)

组分	质量 (g)
中药提取物浸膏	12.00
混合油相	5.00
RH40	15.00
PEG400	5.00
[0119] 卡波姆	1.20
山梨醇	1.50
对羟基苯甲酸丙酯	0.15
依地酸二钠	0.10
水	适量

[0120] 按照实施例1的处方称取薄荷脑、冰片、樟脑、水杨酸甲酯,先取樟脑、薄荷脑和冰片混合研至部分液化,再加入水杨酸甲酯搅拌使完全溶解,作为混合油相。

[0121] 称取实施例1制得的中药提取物浸膏11.13g、MCT 7.37g、RH40 27.75g、PEG400 13.88g、对羟基苯甲酸丙酯0.15g,于20~35℃搅拌40分钟,搅拌速度300-500转/分钟,至药物溶解完全后,缓慢加入适量水,搅拌平衡20分钟,得活血止痛微乳。

[0122] 再称取卡波姆1.20g、依地酸二钠0.10g,加入如上制得的活血止痛微乳,于20~35℃过夜充分溶胀,加入山梨醇1.00g,搅拌均匀,搅拌速度150~350转/分钟,用三乙醇胺调节pH至6~7,即得本发明活血止痛微乳凝胶剂。

[0123] 实施例10本发明活血止痛微乳凝胶剂的制备例九

[0124] 处方9(按100克计)

组分	质量 (g)
中药提取物浸膏	1.75
混合油相	1.15
RH40	11.10
丙二醇	2.78
[0125] 卡波姆	0.80
甘油	5.00
羟苯乙酯	0.075
依地酸二钠	0.05
水	适量

[0126] 按照实施例1的处方称取薄荷脑、冰片、樟脑、水杨酸甲酯,先取樟脑、薄荷脑和冰片混合研至部分液化,再加入水杨酸甲酯搅拌使完全溶解,作为混合油相。

[0127] 称取混合油相1.15g、RH40 11.10g、丙二醇2.78g、羟苯乙酯0.075g,于20~35℃搅拌10分钟,搅拌速度300-500转/分钟,缓慢加入水,搅拌平衡10分钟,加入实施例1制得的中

药提取物浸膏1.75g,搅拌平衡30分钟,即得活血止痛微乳。

[0128] 再称取卡波姆0.80g、依地酸二钠0.05g,加入如上制得的活血止痛微乳,于20~35℃过夜充分溶胀,加入甘油5.00g,搅拌均匀,搅拌速度150~350转/分钟,用三乙醇胺调节pH至6~7,即得本发明活血止痛微乳凝胶剂。

[0129] 实施例11本发明活血止痛微乳凝胶剂的制备例十

[0130] 处方10(按100克计)

	组分	质量 (g)
	中药提取物浸膏	0.80
	混合油相	0.58
	吐温 80	10.0
	丙二醇	5.00
[0131]	卡波姆	0.60
	甘油	2.00
	羟苯乙酯	0.075
	依地酸二钠	0.05
	水	适量

[0132] 按照实施例1的处方称取薄荷脑、冰片、樟脑、水杨酸甲酯,先取樟脑、薄荷脑和冰片混合研至部分液化,再加入水杨酸甲酯搅拌使完全溶解,作为混合油相。

[0133] 称取混合油相0.58g、吐温80 10.0g、丙二醇5.00g、羟苯乙酯0.075g,于20~35℃搅拌10分钟,搅拌速度300~500转/分钟,缓慢加入水,搅拌平衡10分钟,加入实施例1制得的中药提取物浸膏0.87g搅拌平衡30分钟,即得活血止痛微乳。

[0134] 再称取卡波姆0.60g、依地酸二钠0.05g,加入如上制得的活血止痛微乳,于20~35℃过夜充分溶胀,加入甘油2.00g,搅拌均匀,搅拌速度150~350转/分钟,用三乙醇胺调节pH至6~7,即得本发明活血止痛微乳凝胶剂。

[0135] 试验例1本发明制得的活血止痛微乳和微乳凝胶剂的表征

[0136] (1) 本发明制得的活血止痛微乳的表征

[0137] a、平均粒径和PDI测定

[0138] 取1ml各实施例中制得的活血止痛微乳,加入到DTS0012样品池中,分别将样品池放置于Zetasizer Nano ZS纳米粒度仪内测定平均粒径和PDI。

[0139] 结果:实施例6中得到的处方5的活血止痛微乳的平均粒径和PDI分别为:29.16±0.2627nm和0.163±0.010(见图1),同时测定处方1~4和6~10的活血止痛微乳的平均粒径均在20~50nm之间,PDI在0.3以下。

[0140] b、电镜扫描

[0141] 将实施例6中处方5的活血止痛微乳稀释5倍,取一滴稀释的微乳液滴在铜网上,自然晾干10分钟,滴加2%磷钨酸一滴,自然晾干,置于H-7650型透射电子显微镜下观察微乳的形态,如图2所示。



[0142] 结果:活血止痛微乳的液滴呈球形或类球形。

[0143] (2) 本发明制得的活血止痛微乳凝胶的表征

[0144] a、平均粒径和PDI测定

[0145] 取各实施例中制得的活血止痛微乳凝胶适量,加水稀释100倍,磁力搅拌至完全溶解,取1ml活血止痛微乳凝胶剂稀释液加入到DTS0012样品池,分别将样品池放置于Zetasizer Nano ZS纳米粒度仪内测定平均粒径和PDI。

[0146] 结果:实施例6中制得的处方5的活血止痛微乳凝胶剂的平均粒径和PDI分别为:  $29.91 \pm 0.0100\text{nm}$ 和  $0.251 \pm 0.006$  (见图3),同时测定处方1~4和6~10的活血止痛微乳凝胶剂的平均粒径均在20~50nm之间,PDI在0.4以下。

[0147] b、电镜扫描

[0148] 将实施例6制得的处方5的活血止痛微乳凝胶剂用水稀释50倍,取一滴稀释的微乳凝胶液滴在铜网上,自然晾干10分钟,滴加2%磷钨酸一滴,自然晾干30分钟,置于JEM-2200FS型透射电子显微镜下观察微乳凝胶的形态。

[0149] 结果:在透射电镜下观察到稀释的微乳凝胶剂中微乳液滴呈球形或类球形(如图4),凝胶的层状结构被打散呈小片状结构(如图5)。

[0150] c、流变类型的判断

[0151] 采用,测量系统型号为PP50,取适量实施例6制得的活血止痛微乳凝胶剂于平板上,设定剪切速率为0.01~100 1/S,测量温度为25℃,绘制剪切速率与粘度曲线,判断流体类型,如图6。

[0152] 结果:本发明制得的活血止痛微乳凝胶剂在测量范围内粘度随着剪切速率的增大而减小,体现出非牛顿流体的剪切变稀特性,属于假塑性流体类型,说明本发明活血止痛微乳凝胶剂易于涂抹,涂抹过程中不会出现打团的现象。

[0153] 试验例2本发明活血止痛微乳凝胶剂的透皮吸收特性研究

[0154] 采用改良的Franz扩散池,扩散池容积为18mL,有效扩散面积为 $3.14\text{cm}^2$ ,水浴温度设置为  $(32.5 \pm 0.2)^\circ\text{C}$ ,接收液为PEG400-95%乙醇-生理盐水(1:3:6),将接收室内加入搅拌子,并将处理好的透析膜固定在扩散室与接收室之间。称取0.35g实施例6制备的活血止痛微乳凝胶均匀涂布于扩散室内的透析膜上,平行5份,在接收室中注满接收液,排除气泡,磁力搅拌器设置转速为 $350\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,分别于时间点为0.5、1、2、4、6、8、12和24h将接收液全部倒出,同时补加同体积的新鲜接收液。将收集的各接受液过 $0.22\mu\text{m}$ 微孔滤膜,取续滤液,即得供试品溶液。

[0155] 将供试品溶液进样于超高效液相色谱仪:ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub>色谱柱(2.1mm × 50mm, 1.7μm),流动相乙腈(A)-0.1%甲酸水(B)梯度洗脱(0~4min, 10%~90%A),检测波长280nm,柱温30℃,流速 $0.6\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,进样量1μL。测定供试品溶液中丹皮酚、丁香酚和水杨酸甲酯的峰面积,计算3种待测成分的累积释放量,计算累计释放率Q,以累积释放率Q对时间t作图,绘制累积透过曲线,见图7。

[0156] 累计释放率Q通过以下公式计算:

$$[0157] \quad Q = \left[ \sum_{i=1}^n C_i \right] \times V/W \times 100$$

[0158] 其中,  $C_n$  为第  $n$  次取样时接收液中各待测成分的质量浓度,  $V$  为每次取样的体积,  $W$  为所取凝胶中各待测成分的含量。

[0159] 结果: 本发明制得的活血止痛微乳凝胶剂中丹皮酚、丁香酚和水杨酸甲酯 24h 的累积释放率分别为 76.64%、78.44% 和 62.94%, 说明本发明活血止痛微乳凝胶剂具有良好的透皮性能。

[0160] 试验例 3 本发明活血止痛微乳凝胶剂的药效学研究

[0161] 实验分组及给药: 将昆明种小鼠, 雄性, 体重 19-21g, 随机分为 5 组, 每组 11 只。对照组: 涂抹等量空白基质; 阳性药组, 涂抹扶他林软膏 0.1g/20g 体重; 本发明活血止痛微乳凝胶剂大、中、小剂量组, 按 0.092、0.046、0.023g/20g 体重涂抹实施例 6 制得的活血止痛微乳凝胶剂。每日 1 次, 给药 4-6h 去除药膏, 清洁皮肤, 连续 3 天。

[0162] 观察指标:

[0163] a. 20 分钟内各鼠出现扭体反应的次数及药物对扭体反应的抑制率。

[0164] 抑制率 = (对照组扭体均数 - 受试药组扭体均数) / 对照组扭体均数 × 100%

[0165] b. 腹腔液吸光度值 (OD)

[0166] 实验方法: 实验各组给药 3 天, 每天 1 次。第 3 天于给药后 40 分钟, 动物腹腔注射 0.6% 醋酸 0.1ml/10g 体重, 观察 20 分钟内各组出现扭体反应的次数, 以腹腔内凹, 伸展后肢, 臀部抬高为阳性指标。

[0167] 于给药后 1 小时, 各鼠静脉注射 0.5% 伊文思蓝生理盐水溶液 0.1ml/10g 体重, 20 分钟后脱颈椎处死, 剪开腹部皮肤肌肉, 5ml 生理盐水分数次洗涤腹腔, 吸管吸出洗涤液合并, 3000rpm 离心 15 分钟, 取上清液于 590nm 比色测定 OD 值。

[0168] 应用 SPSS19.0 统计软件, 数据以  $\bar{x} \pm SD$  表示, 多组间比较使用单因素方差分析, 考察活血止痛微乳凝胶剂对小鼠的抗炎、镇痛作用。实验结果见下表 2。

[0169] 表 2 活血止痛微乳凝胶剂镇痛抗炎作用考察 ( $\bar{x} \pm SD$ )

[0170]

组别	剂量 (g 生药/kg)	动物数 (只)	体重 (g)	吸光度	扭体	
					次数	抑制率%
对照组	--	9	21.94±0.95	0.804±0.174	31.4±11.1	--
阳性药物 组	5.0	8	21.7±1.53	0.420±0.199**	6.8±5.6***	78.27
大剂量组	0.52	8	20.98±1.22	0.550±0.237*	14.6±10.2***	53.45

[0171]

中剂量组	0.26	8	21.15±1.25	0.552±0.251*	14.7±8.9***	53.25
小剂量组	0.13	8	21.14±1.34	0.526±0.196*	11.9±8.7***	62.23

[0172] 注: 与对照组比较, \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$

[0173] 结论: 由上表可见, 与对照组比较, 本发明微乳凝胶剂各剂量组吸光度及扭体次数均明显低于对照组, 扭体抑制率均在 50% 以上。如上可知, 本发明活血止痛微乳凝胶剂各剂

量均能减轻由化学刺激引起的模型动物的腹部疼痛,减少腹腔内毛细血管的炎性渗出,降低毛细血管通透性。

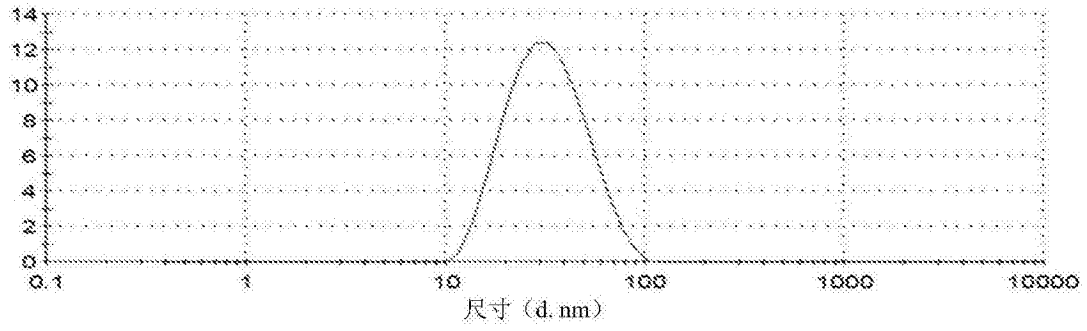


图1

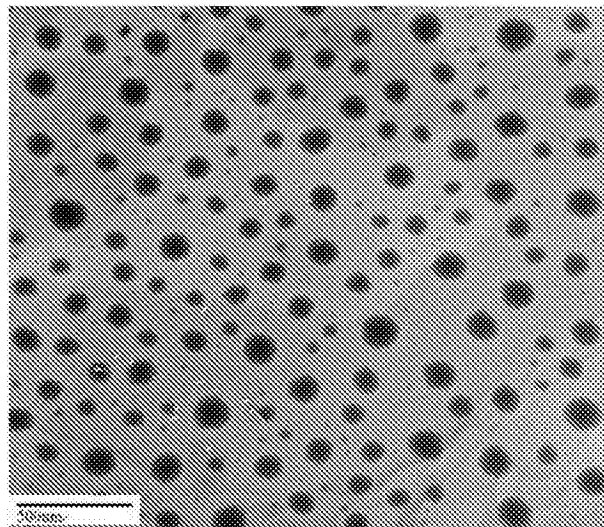


图2

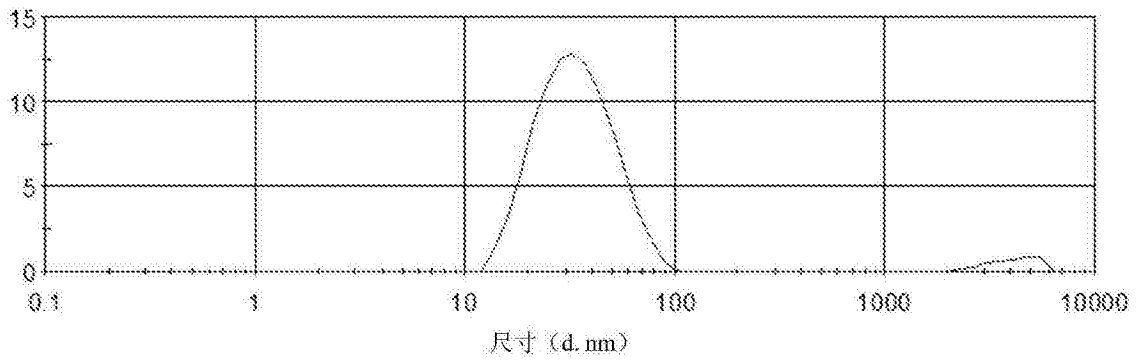


图3

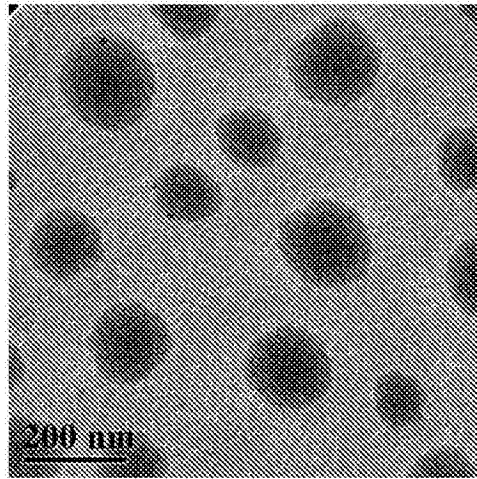


图4

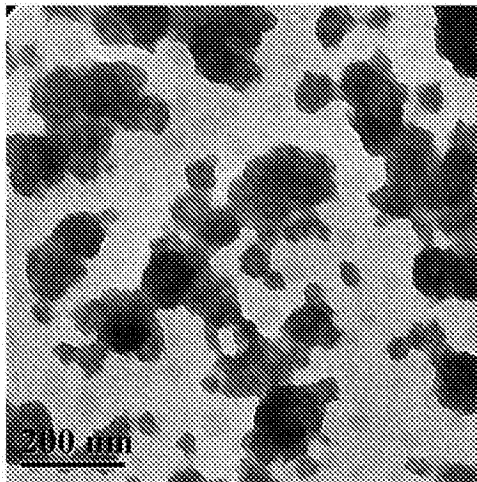


图5

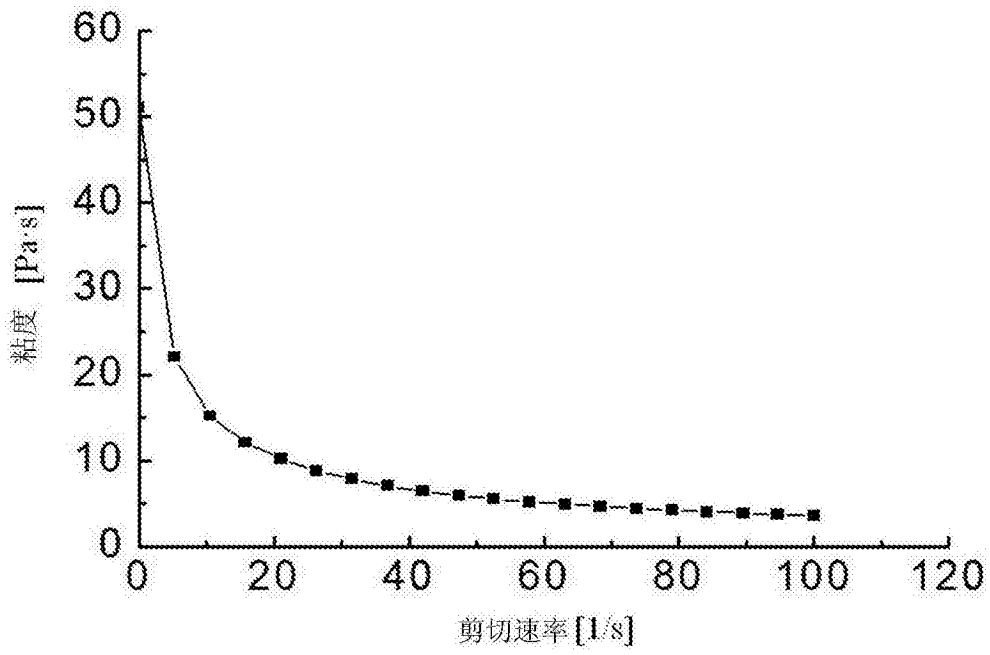


图6

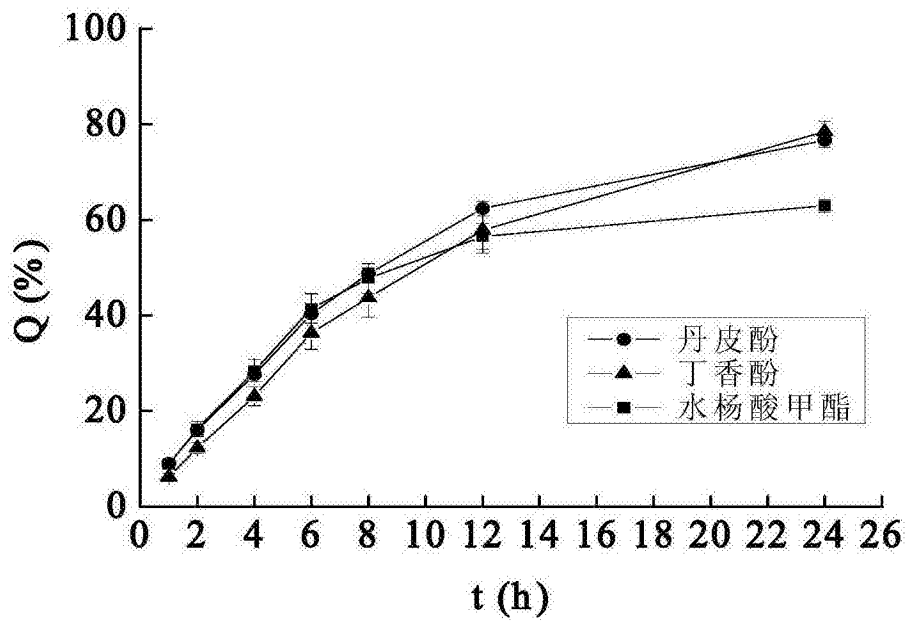


图7