

V_C 与 V_E 复方微乳的制备及其质量评价^{*}

董红宾^{a, b}, 欧阳五庆^{a, b}, 张春梅^a, 曹发昊^{a, b}

(西北农林科技大学 a 动物科技学院, b 国家生命科学与技术人才培养基地, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 用合适的表面活性剂 V_E 油溶液和 V_C 水溶液制备一种适合皮肤涂抹用药的 V_C 和 V_E 复方微乳, 并用透射电子显微镜测定其粒径, 高速离心法、温度梯度法和恒温加速试验检验其稳定性, 紫外分光光度法测其有效成分含量, 急性毒性试验、皮肤刺激性试验、眼刺激性试验检验其安全性。结果表明, 制备的 V_C 和 V_E 复方微乳粒径为 10~100 nm, 符合微乳的粒径要求。样品经 4 000 r/min 离心 30 min 和 37℃ 相对湿度为 75% 的条件下保存 3 个月均保持澄清透明, 未见分层或絮凝, 其稳定温度范围为 4~60℃。样品中 V_C 和 V_E 的含量分别为 (182.91 ± 2.39) 和 (13.97 ± 0.60) mg/mL, 平均回收率分别为 103.3% 和 96.7%。该 V_C 和 V_E 复方微乳无经口毒性、皮肤刺激性和眼刺激性, 适合用于皮肤给药。

[关键词] V_C 与 V_E 复方微乳; 微乳稳定性; 微乳安全性

[中图分类号] Q 56; R 965.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)01-0058-05

Study on the preparation and quality evaluation of vitamin C and vitamin E combination micro-emulsion

DONG Hong-bin^{1, 2}, OU YANG Wu-qin^{1, 2}, ZHANG Chun-mei¹

(1 College of Animal Science and Technology, 2 National Base of Life Science and Technology,
Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: To prepare a vitamin C and vitamin E combination micro-emulsion with suitable surfactant, vitamin E oily solution and vitamin C aqueous solution and evaluate its average diameter, physical stability, containing concentration of vitamin C or vitamin E and Safety by electron microscope, stability tests, uv spectrophotometry, and safety were tested respectively. The results showed that the average diameter of the sample was 10-100 nm, which accorded with that of micro-emulsion. It was stable after going through centrifugation at 4 000 rpm for 30 min and storage at 37℃ for three months, the range of the stable temperature was 4-60℃. The accuracy of assaying was good. The results of the safety evaluations showed that the micro-emulsion had no toxicity and stimulation to the skin and eyes. So, vitamin C and vitamin E combination micro-emulsion is suitable for skin drug delivery systems.

Key words: Vitamin C; Vitamin E; micro-emulsion; stability; safety

维生素 C (V_C) 和维生素 E (V_E) 是常见的抗氧化剂, 单独使用时均有抗氧化损伤、增强机体免疫功能等作用。有研究^[1-3]表明, 这 2 种维生素还具有协同增效作用。但由于 V_C 为水溶性, 而 V_E 为脂溶性,

二者的结合使用尚有一定困难。特别是透皮给药时, 只能勉强制成普通乳状液。但普通乳状液具有形成困难、生产成本低、不稳定、易发生聚结和粒径大、不易吸收等缺点, 从而限制了其临床应用。因此, 研制

* [收稿日期] 2006-06-14

[基金项目] 西北农林科技大学校长专项基金项目(130709)

[作者简介] 董红宾(1981-), 男, 河南宝丰人, 在读硕士, 主要从事纳米生物学研究。

[通讯作者] 欧阳五庆(1960-), 男, 陕西凤翔人, 教授, 博士生导师, 主要从事纳米药理学、细胞生物学研究。E-mail: oywq506@sina.com

V_C 与 V_E 的复方制剂具有重要意义。

近年来,微乳作为药物的载体受到广泛的关注,且已应用于多种药物,如利多卡因、布洛芬、酮洛芬等透皮给药制剂^[4-6]。与普通乳状液相比,微乳粒径只有 10~100 nm,稳定性好,渗透力强,可显著提高药物的生物利用度;再加上微乳可以自发形成,其生产成本大大低于普通乳状液。本试验研制成一种水包油型 V_C 与 V_E 复方微乳,并对其稳定性和安全性进行检验,旨在开发一种适合透皮给药、安全无毒、又能有效地发挥 V_C 与 V_E 协同作用的复方新剂型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 白色豚鼠(质量 350~450 g),新西兰家兔(质量 1.5~2.5 kg)和昆明种远交系健康小鼠(质量 18~22 g),均购自第四军医大学。

1.1.2 主要试剂 V_C 和 V_E 购自瑞士-罗氏公司;聚氧乙烯醚(40) 氢化蓖麻油(RH-40)购自山东永发化工厂;肉豆蔻酸异丙酯(MP)购自杭州高绮香精公司;高锰酸钾、无水乙醇、亚甲基蓝和苏丹红等均购自北京化学试剂公司。

1.2 V_C 与 V_E 复方微乳的制备

将 V_E 和 IPM 按 1:4(质量比)混合均匀,配制混合油备用。将 V_C 溶于蒸馏水中配置成质量分数 25% 的水溶液。以 RH-40 为表面活性剂,按 9:1~1:9 的规律改变表面活性剂和混合油的比例,配制 9 种混合液,再逐滴加入 V_C 水溶液,搅拌均匀,直到形成澄清透明的微乳液。采用表面活性剂用量最少的配方制备 V_C 与 V_E 复方微乳,进行以下试验。

1.3 V_C 与 V_E 复方微乳类型的鉴定

将水溶性的亚甲基蓝和油溶性的苏丹红分别滴加到微乳制剂中,观察两种染色剂在微乳制剂中的扩散速度。如果亚甲基蓝的扩散速度快,则微乳为水包油(O/W)型;如果苏丹红的扩散速度快,则为油包水(W/O)型;二者一样快,则为双连续型^[7]。

1.4 V_C 与 V_E 复方微乳液粒径的测定

取适量 V_C 与 V_E 复方微乳制剂,用蒸馏水稀释 10 倍后,夹取铜网浸入其中,数分钟后,取出,经 20 g/L 的磷钨酸染色后,灯光下烤干,电镜观察。

1.5 V_C 与 V_E 复方中 V_C 和 V_E 含量的测定^[8]

制备 3 批样品,用于 V_C 和 V_E 含量测定。

1.5.1 V_C 含量的测定 标准曲线的制备。分别

精密称取一定量 V_C 标准品置于 50 mL 容量瓶中,再分别加入 2.0 mL $KMnO_4$ 溶液(2.3×10^{-3} mol/L)和 6 mL H_2SO_4 (1 mol/L),蒸馏水定容至刻度,配制成 V_C 浓度分别为 200, 150, 100, 50 $\mu g/mL$ 的标准溶液,紫外分光光度法测其在 580 nm 处的吸光度($A_{标}$)。取 2.0 mL $KMnO_4$ 溶液(2.3×10^{-3} mol/L)和 6 mL H_2SO_4 (1 mol/L)于 50 mL 容量瓶中,蒸馏水定容至刻度,测其吸光度(A_{0-}),计算 $\Delta A_{标}$: $\Delta A_{标} = A_{0-} - A_{标}$ 。样品中 V_C 含量的测定。取 2.0 mL $KMnO_4$ 溶液(2.3×10^{-3} mol/L)和 6 mL H_2SO_4 (1 mol/L)置于 50 mL 容量瓶中,加入样品溶液 2 mL,蒸馏水定容至刻度,测其吸光度($A_{样}$),计算样品 $\Delta A_{样}$: $\Delta A_{样} = A_{0-} - A_{样}$ 。加标回收率的测定。取 2.0 mL $KMnO_4$ 溶液(2.3×10^{-3} mol/L)和 6 mL H_2SO_4 (1 mol/L)置于 50 mL 容量瓶中,加样品溶液 2 mL,再加入 0.0025 g V_C 对照品,蒸馏水定容至刻度,测其吸光度($A_{加标}$),计算加标溶液 $\Delta A_{加标}$: $\Delta A_{加标} = A_{0-} - A_{加标}$ 。平行测定 3 次,求其平均值。

1.5.2 V_E 含量的测定^[9] 标准曲线的制备。精密称取 V_E 对照品 0.10 g 置于 50 mL 容量瓶中,加无水乙醇溶解并稀释定容至刻度,作为对照备用液。精密吸取对照备用液 2 mL,置于 50 mL 容量瓶中,加无水乙醇稀释定容至刻度,作为对照品溶液。分别精密吸取对照品溶液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 和 5.0 mL 置于 50 mL 容量瓶中,加无水乙醇稀释定容至刻度,摇匀,紫外分光光度法测其 285 nm 处的吸光度($A_{标}$)。 V_E 含量的测定。取 1 g 微乳液于 50 mL 容量瓶中,加无水乙醇溶解并稀释定容至刻度,摇匀,285 nm 处测样品液的吸光度($A_{样}$)。加标回收率的测定。取 1 g 微乳液于 50 mL 容量瓶中,再加入 0.001 g V_E 对照品,加无水乙醇溶解并稀释定容至刻度,摇匀,285 nm 处测加标溶液的吸光度($A_{加标}$),平行测定 3 次。

1.6 V_C 与 V_E 复方微乳稳定性检验

分别用高速离心法(4 000 r/min, 30 min)、温度梯度法(分别在 0, 4, 25, 40, 60 和 80 $^{\circ}C$ 水浴环境中放置半个月)和恒温加速法(37 $^{\circ}C$ 及相对湿度为 75% 的条件下保存 3 个月)检验其稳定性,观察是否有分层、絮凝或沉淀等现象发生。

1.7 V_C 与 V_E 复方微乳急性毒性试验

选昆明种远交系健康小鼠 20 只(雌雄各半),试验前禁食 16 h 后,按 6 000 mg/kg(按 V_C 计)的剂量一次性经口灌胃 V_C 与 V_E 复方微乳。灌胃后,连续

14 d 观察动物中毒表现并计数死亡小鼠, 计算 LD_{50} 。根据 GB 7919- 87《化妆品安全性评价程序和方法》进行刺激强度评价: $LD_{50} < 1$ 时判为极毒, $1 \leq LD_{50} < 50$ 时为剧毒, $50 \leq LD_{50} < 500$ 时为中等毒, $500 \leq LD_{50} < 5000$ 时为低毒, $LD_{50} \geq 5000$ 时为无毒。

1.8 V_C 与 V_E 复方微乳急性皮肤刺激试验

取白色豚鼠 20 只, 雌雄各半。实验前 24 h 在背部两侧剪毛, 去毛范围左右各约 $3.0\text{ cm} \times 6.0\text{ cm}$ 。吸取微乳 0.1 mL 涂在 $2.5\text{ cm} \times 2.5\text{ cm}$ 的四层纱布上, 敷贴在右侧皮肤上, 然后用一层油纸覆盖, 再用无刺激性胶带和绷带加以固定。左侧用蒸馏水作为对照, 敷贴时间为 24 h。试验结束时用温水除去残留微乳。于除去微乳后 1, 24 和 48 h 观察敷贴部位皮肤反应, 根据 GB 7919- 87《化妆品安全性评价程序和方法》进行皮肤反应积分和刺激强度评价: 分值 $0 \sim 0.4$ 为无刺激性, $0.5 \sim 1.9$ 为轻刺激性, $2.0 \sim 5.9$ 为中等刺激性, $6.0 \sim 8.0$ 为强刺激性。

1.9 V_C 与 V_E 复方微乳眼刺激试验

取 10 只健康家兔进行单次给药眼刺激性试验, 雌雄各半。将 0.1 mL 微乳液滴入受试动物右眼结膜囊内, 左眼用同等量的生理盐水为对照。滴药后使眼被动闭合 $5 \sim 10\text{ s}$, 记录滴药后 1, 6, 24, 48, 72 h 眼的局部反应。将受试组每一家兔、每一检查时间的眼角膜、虹膜和结膜的刺激反应分值相加得总积分, 积分总和除以动物数, 即得受试组最后分值, 同样方法计算对照组最后分值, 以 Draize 眼部刺激试验评价标准^[10]判断受试动物眼刺激程度: 分值 $0 \sim 3$ 为无刺激性, $4 \sim 8$ 为轻度刺激性, $9 \sim 12$ 为中度刺激性, $13 \sim 16$ 为强刺激性。

2 结果与分析

2.1 V_C 与 V_E 复方微乳的配方

结果显示, 当表面活性剂和油的质量比为 9 1, 8 2 和 7 3 时, 均能形成微乳, 其他配比不能形成。已有研究表明, 表面活性剂含量越低, 毒性越小, 同时增溶的 V_E 含量也越高^[11]。故采用表面活性剂和油为 7 3 时的配方。

2.2 V_C 与 V_E 复方微乳的类型鉴定

亚甲基蓝在微乳中的扩散速度明显快于苏丹红, 表明本研究所制备的微乳均为水包油(O/W)型。

2.3 V_C 与 V_E 复方微乳的粒径

结果表明, V_C 和 V_E 复方微乳粒径均在 $10 \sim$

100 nm , 均一性良好, 其电镜照片见图 1。

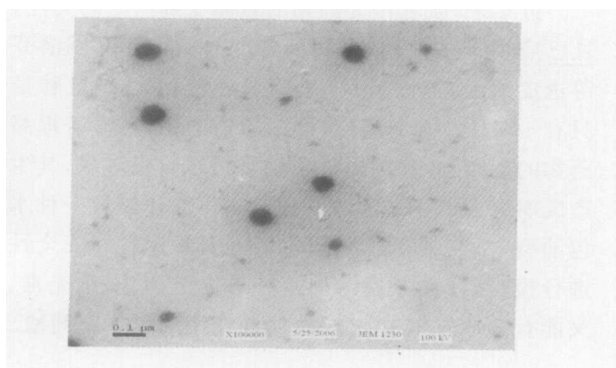


图 1 V_C 与 V_E 复合微乳液的电镜照片

Fig 1 Transmission electron micrograph of vitamin C and vitamin E combination micro-emulsion

2.4 V_C 与 V_E 复方微乳中 V_C 和 V_E 的含量

2.4.1 V_C 含量 结果表明, 在 525 nm 处高锰酸钾吸光度的变化值 ΔA 与 V_C 浓度在 $0 \sim 240\text{ }\mu\text{g/mL}$ 呈线性关系, 回归方程为: $\Delta A = 0.0001C - 0.0045$ ($n = 5$), $R = 0.9995$ 。平均回收率为 103.3% , RSD 为 4.98% 。3 批样品中 V_C 平均含量为 $(182.91 \pm 2.39)\text{ mg/mL}$ 。

2.4.2 V_E 含量 以吸光度(A)对浓度(C)进行线性回归结果表明, 在 $40 \sim 198\text{ }\mu\text{g/mL}$ 间与吸光度呈良好的线性关系, 回归方程为: $A = 0.0045C + 0.007$ ($n = 5$), $R = 0.9997$ 。平均回收率为 99.67% , $RSD = 1.26\%$ 。 V_E 含量为 $(13.97 \pm 0.60)\text{ mg/mL}$ 。

结果显示, 该复方微乳中 V_C 和 V_E 的含量均能达到各自在其他制剂中的最小规格(V_C 为 $2\text{ mL} : 0.1\text{ g}$; V_E 为 $1\text{ mL} : 5\text{ mg}$), 从而在载药量上达到可应用水平。

2.5 V_C 与 V_E 复方微乳的稳定性

制备的 3 批 V_C 与 V_E 复方微乳经 4000 r/min 离心 30 min 及 37°C 、相对湿度为 75% 的条件下保存 3 个月, 结果均保持澄清透明, 未曾发生分层或者絮凝现象。温度梯度试验结果显示, 该微乳在 $4 \sim 60^\circ\text{C}$ 的温度范围内放置半个月均能保持澄清透亮, 无分层或絮凝发生。该微乳在 0 和 80°C 水浴环境中短时间内即会出现分层现象, 但转移到室温后还能恢复到透明状态。

2.6 V_C 与 V_E 复方微乳安全性

2.6.1 急性毒性 小鼠灌胃后 2 周内无一死亡, 表明 V_C 与 V_E 复方微乳对小鼠急性毒性的 $LD_{50} > 5000\text{ mg/kg}$, 属于实际无毒级别。

2.6.2 急性皮肤刺激试验 由表 1 可知, 微乳组对

豚鼠皮肤的刺激指数均在 0~ 0.4, 无皮肤刺激性。

表 1 V_C 与 V_E 复方微乳对豚鼠皮肤刺激性试验结果

Table 5 Results of the skin irritation test on guinea pigs with vitamin C and vitamin E combination micro-emulsion				
组别 Group	剂量/(mL · 只 ⁻¹) Dose	分值 Score		
		1 h	24 h	48 h
微乳组 Micro-emulsion group	0.1	0.2	0	0
对照组 Control group	0.1	0	0	0

2.6.3 急性眼刺激性 表 2 结果显示, V_C 与 V_E 复方微乳单次给药对家兔眼睛的刺激指数在 0~ 3, 角膜、结膜和虹膜均无明显病理性变化, 表明该微乳无刺激性。

表 2 V_C 与 V_E 复方微乳对家兔眼刺激试验结果

Table 2 Results of the ocular irritation test on rabbits with vitamin C and vitamin E combination micro-emulsion					
组别 Group	剂量/(mL · 只 ⁻¹) Dose	分值 Score			
		1 h	24 h	48 h	72 h
微乳组 Micro-emulsion group	0.1	2.1	1.5	0.8	0.3
对照组 Control group	0.1	0.3	0.1	0	0

3 讨 论

3.1 V_C 与 V_E 复方微乳的制备

本研究根据微乳形成的机理和 V_C、V_E 的物理性质, 制备出 V_C 和 V_E 复方微乳。V_C 由于其水溶性而处于连续相中, 而 V_E 由于其脂溶性而处于分散相中, 从而将两者有效地统一在一种剂型之中。与 V_C 和 V_E 传统的制剂相比, 该复方微乳一方面能发挥微乳本身的易制备、稳定性高、渗透性好等优点, 还能协同发挥 V_C 和 V_E 的抗氧化、抗衰老等作用, 从生产成本到质量控制, 再到生物学效果, 该复方微乳均具有更明显的优点。

根据微乳的形成机理, 当表面活性剂的亲水亲油平衡 (HLB) 值与油所需的 HLB 值相等或接近时, 容易形成微乳^[12]。本研究尝试单独使用 V_E 油来制备微乳, 结果不能形成。说明 V_E 油所需的 HLB 值与所用的表面活性剂 (RH-40, 其 HLB 值为 14) 的 HLB 值相差太远, 因此只能将 V_E 溶于合适的油中, 以复配油即 V_E 的油溶液为油相制备微乳, 这就大大降低了微乳中 V_E 的含量。因为维生素在油中的复配比例不能太大, 否则将不能形成微乳。为了增大微乳中 V_E 的含量, 可以考虑筛选合适的表面活性剂, 使其与单独的 V_E 即可形成微乳。但这一工作难度较大, 因为 V_E 所需的 HLB 值并不知道, 只能通过试验慢慢摸索, 如果在 8 以下, 则无论选用何种表面活性剂也难形成 O/W 型微乳, 只能制成 W/O 型, 而 W/O 型微乳黏性太大, 肤感差, 很难推广应用; 另外, 上述二者 HLB 值必须接近才能形成微乳的规律只是微乳形成的必要条件, 而非充分条

件。因此, 如何增大 V_E 在微乳中的含量, 还需要进一步研究。

由于 V_C 在水中具有较高的溶解度, 因此可方便地控制它在微乳中的含量, 从而制备出不同规格的微乳制剂。

3.2 温度对该复方微乳稳定性的影响

对于非离子型表面活性剂微乳, 温度的改变将会影响非离子型表面活性剂亲水基的水化度。一般情况下, 随着温度的升高, 非离子型表面活性剂亲水基的水化度降低, 亲水性下降, 微乳从水包油型向油包水型转化, 表面活性剂从体系中析出, 微乳整体上表现出分层或者浑浊现象^[13]。本研究制备的复方微乳在 60℃ 时还能保持稳定, 但在 80℃ 时即出现分层, 这可能是因为 80℃ 已超过 RH-40 的浊点, 从而失去稳定性。另外, 该复方微乳在 4℃ 时也能保持稳定, 但在 0℃ 时就开始分层、浑浊, 原因可能是该温度已达水的凝固点, 水分子热运动下降, 水分子之间有结晶倾向, 从而影响了与表面活性剂的相互作用; 同时, 由于温度的降低, V_C 的溶解度也下降, 从体系中析出, 从而使微乳变得浑浊。

3.3 V_C 与 V_E 复方微乳的安全性

在皮肤刺激和眼刺激试验中, V_C 和 V_E 复方微乳刚开始都有一定程度的刺激性, 但刺激指数都未超出相关评价的无刺激范围, 且在短时间内都能恢复。这些刚开始的刺激, 可能是因为机体对任何外来异物均有一个生理适应的过程, 在该过程中, 机体并未出现病理性的变化, 这说明该复方微乳是安全的。

3.4 V_C 与 V_E 复方微乳的应用

一方面, 该 V_C 和 V_E 复方微乳可以单独作为透

皮给药制剂使用, 另一方面, 外相中的极性环境还可方便地添加其他水溶性的药物, 即可以以该复方微乳为基础, 再加入其他的有效成分, 从而制备出具有更多功能的药物或化妆品用微乳复合物。

通过对 V_C 和 V_E 复方微乳一系列的稳定性和安全性评价, 可以看出, 该 V_C 和 V_E 复合微乳制备工艺简单, 稳定性好, 安全性高, 从而为其在医药和化妆品工业中的应用提供了依据。另外, 本研究也为开发其他药物剂型提供了一条新思路。

[参考文献]

- [1] 王璇, 陆征丽, 常红, 等. 维生素C、E对体外血管内皮细胞氧化损伤保护作用的研究[J]. 天津医科大学学报, 2005, 11(2): 187-194
- [2] 陈忠, 桂鸣, 周秀娟, 等. 联用维生素C、E对高血压病人血管内皮活性物质和舒张功能的影响[J]. 南京医科大学学报, 2001, 21(3): 266-267
- [3] 张松林, 黄杰, 涂中凡, 等. V_C 和 V_E 对移植肺再灌注损伤保护作用的实验研究[J]. 中国急救医学, 2003, 23(4): 215-216
- [4] 陈华兵, 翁婷, 常雪灵, 等. 布洛芬微乳的制备及其透皮吸收研究[J]. 中国药学杂志, 2004, 39(1): 43-45
- [5] Rhee Y S, Choi J G, Park E S, et al. Transdermal delivery of ketoprofen using microemulsions[J]. Int J Pharm, 2001, 228: 161
- [6] Kreilgaard M, Pedersen E J, Jaroszewski J W. NMR characterization and transdermal drug delivery potential of microemulsion systems[J]. J Controlled Release, 2000, 69: 421
- [7] 张建春, 李培勋, 王原, 等. 环磷酰胺微乳制剂的研制[J]. 中国医院药学杂志, 2003, 23(1): 9-11
- [8] 阎家伟, 黄运瑞. 分光光度法测定药片中维生素C的含量[J]. 南阳师范学院学报, 2005, 4(12): 54-55
- [9] 中国药典委员会. 中国药典[M]. 2000年版. 北京: 化学工业出版社, 2000: 799
- [10] 林艳琼, 甘莉, 甘勇, 等. 地塞米松眼用微乳的研究[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(5): 358-362
- [11] 陆彬, 张正全. 用三角相图法研究药用微乳的形成条件[J]. 药学报, 2001, 36(1): 58-62
- [12] 史同瑞, 许腊梅, 于万才, 等. 微乳基质成乳条件与稳定性研究[J]. 动物医学进展, 2005, 06(27): 97-99
- [13] 王晓黎, 蒋雪涛, 李干佐, 等. 非离子型表面活性剂微乳的基础研究[J]. 解放军药学报, 2001, 17(6): 297-300
- [4] 杨惊宇, 严冬. 新型药物制剂——微乳[J]. 中国医学工程, 2005, 7(4): 378-382
- [5] 林艳群, 甘勇, 甘莉, 等. 地塞米松眼用微乳的研究[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(5): 358-361
- [6] 汪杨, 吴伟, 阙俐. 油-吐温-醇-水体系伪三元相图在自微乳化制剂研究中的应用[J]. 中国医药工业杂志, 2005, 36(6): 345-348
- [7] 李健强, 李六金. 兽医微生物学实验指导[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1991: 156-165
- [8] XU F. Polysorbate-80 and its pharmaceutical application[J]. Chin Pharm J, 1991, 26(8): 459-462
- [9] 王晓黎, 蒋雪涛, 刘皋林, 等. 环孢素A微乳口服液的制备及稳定性研究[J]. 中国现代应用药学杂志, 2004, 21(1): 40-43
- [10] Lianli Li, Int ranasal Nandi, Kwon H Kim. Development of an ethyllaurate-based microemulsion for rapid-onset intranasal delivery of diazepam[J]. Int J Pharm, 2002, 23(7): 77-85
- [11] Al-Athman I S, Khalil E, Al-Hmoud N D, et al. Microemulsions are membrane active antimicrobial, self preserving systems[J]. J Appl Microbiol, 2000, 89(1): 32-39

(上接第 57 页)