

# 不同超声辅助提取桂花黄酮及其抑菌性

邵越楣<sup>1</sup>, 李婷婷<sup>1\*</sup>, 吴彩娥<sup>1</sup>, 段一凡<sup>2</sup>, 王贤荣<sup>2</sup>,  
陈林<sup>2</sup>, 李旭<sup>3</sup>, 王磊<sup>1</sup>

(1. 南京林业大学 轻工与食品学院, 江苏 南京 210000; 2. 南京林业大学 生态与环境学院, 江苏 南京 210000; 3. 南京国环有机产品认证中心有限公司, 江苏 南京 210000)

**摘要:** 为了探究桂花黄酮的最佳提取工艺及其对白色念珠菌的抑菌效果, 对超声提取法、超声辅助酶提取法和超声辅助双水相提取法提取桂花黄酮的提取率进行了比较, 获得提取率最高的方法, 并通过单因素和响应面实验优化提取工艺。采用超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 对 4 个品种的桂花黄酮提取物进行了单体成分的鉴定; 并测定了 4 个品种桂花黄酮对白色念珠菌的最小抑菌浓度 (MIC) 及其对菌体细胞膜完整性和生物膜形成的影响。结果表明, 经超声提取桂花黄酮的提取率最高, 在温度 50 °C、液固比 17 : 1 (mL : g)、乙醇体积分数 52% 的条件下, 金桂、银桂、丹桂、四季桂的提取率分别为 13.88%±0.29%、8.79%±0.56%、13.16%±0.33% 和 10.28%±0.41%; 4 种桂花黄酮中, 金桂提取的黄酮对白色念珠菌的抑菌效果最好, MIC 为 1.50 g/L, 能显著提高白色念珠菌细胞膜的通透性, 导致细胞内容物泄漏, 抑制生物膜的形成, 丹桂黄酮抑制率最高, 可达 46.59%。

**关键词:** 桂花; 黄酮; 响应面优化; 抑菌活性; 白色念珠菌; 分离技术

中图分类号: R284.2; O657.63; TQ028

文献标识码: A

文章编号: 1003-5214 (2023) 12-2705-09

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



## *Osmanthus fragrans* flavonoids extracted by different ultrasound-assisted processes and its antibacterial activity

SHAO Yuemei<sup>1</sup>, LI Tingting<sup>1\*</sup>, WU Cai'e<sup>1</sup>, DUAN Yifan<sup>2</sup>, WANG Xianrong<sup>2</sup>,  
CHEN Lin<sup>2</sup>, LI Xu<sup>3</sup>, WANG Lei<sup>1</sup>

(1. College of Light Industry and Food Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210000, Jiangsu, China; 2. College of Ecology and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210000, Jiangsu, China; 3. Organic Food Development and Certification Center of China Co., Ltd., Nanjing 210000, Jiangsu, China)

**Abstract:** In order to determine the optimal extraction process of *Osmanthus fragrans* flavonoids and their antibacterial effect on *Candida albicans* (*C. albicans*), three methods, ultrasonic extraction, ultrasonic-assisted enzyme extraction and ultrasonic-assisted double aqueous phase extraction, were compared for their extraction rates of *Osmanthus fragrans* flavonoids. The method with the highest extraction rate was selected for process optimization by single factor and response surface experiments. The components of four kinds of *Osmanthus fragrans* flavonoids were identified by liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The inhibition effects of the four *Osmanthus fragrans* flavonoids on *C. albicans* in terms of minimum inhibitory concentration (MIC), cell membrane integrity and biofilm formation were analyzed. The results showed that, under the optimal extraction process of temperature 50 °C, liquid-solid ratio 17 : 1 (mL : g), and ethanol volume fraction 52%, the extraction rates of *Thunbergii* group, *Latifolius* group, *Aurantiacus* group, and *Semperflorens* group were 13.88%±0.29%, 8.79%±0.56%, 13.16%±0.33%, and 10.28%±0.41%, respectively. The four *Osmanthus fragrans* flavonoids displayed different antibacterial effect on *C. albicans*, among which, *Osmanthus fragrans* var. *thunbergii* exhibited the best antifungal effect

收稿日期: 2023-04-09; 定用日期: 2023-06-06; DOI: 10.13550/j.jxhg.20230289

作者简介: 邵越楣 (1998—), 女, 硕士生, E-mail: shaoyuem@163.com。联系人: 李婷婷 (1982—), 女, 副教授, E-mail: lttjfu@njfu.edu.cn。

with MIC of 1.50 g/L, significantly improved the *C. albicans* cell membrane permeability, led to the efflux of cell contents, and inhibited the biofilm formation with the inhibition rate of flavonoid of *Aurantiacus* group reaching up to 46.59%.

**Key words:** *Osmanthus fragrans*; flavonoids; response surface optimization; antibacterial activity; *Candida albicans*; separation technology

龋齿是全世界最常见的细菌性慢性人类口腔疾病, 六岁及以下的儿童早期龋齿在各国蔓延, 已成为一个严重的儿童口腔健康问题。白色念珠菌 (*Candida albicans*, 简称为 *C. albicans*) 是龋齿形成中重要的致病菌之一, 它能黏附于牙釉质表面, 并利用菌丝入侵牙本质和牙髓腔内<sup>[1]</sup>。*C. albicans* 作为一种在人体多个器官存在的致病菌, 在人体免疫力下降时会大量繁殖造成感染, 危害人体健康<sup>[2-5]</sup>。*C. albicans* 不仅能利用蔗糖、葡萄糖和麦芽糖等碳水化合物产生有机酸和二氧化碳, 并在口腔中形成碳酸, 还能分泌天冬氨酸蛋白酶并在酸性条件下溶解正常的牙本质胶原前体<sup>[6]</sup>。因此, 寻找 *C. albicans* 的天然抑菌剂对于为龋齿的临床防治具有重要意义。

桂花 (*Osmanthus fragrans* Lour., 简称为 *O. fragrans*), 木犀科木犀属, 是中国十大传统名花之一。中国桂花有 150 多个品种, 可分为丹桂、银桂、金桂和四季桂 4 个品种群。桂花富含黄酮类、酚类、萜类、木脂素类、苯丙素类等 100 多种有效成分, 具有抗氧化、抗炎、抑菌、抗肿瘤、保护神经、抗衰老等药理活性<sup>[7]</sup>。近年来, 大量文献研究表明, 桂花中含有多种抗菌成分, 其中纯化后的桂花黄酮对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和变形链球菌具有抑菌效果, 表明桂花黄酮有作为天然抑菌剂的潜能<sup>[8-10]</sup>。但是桂花黄酮对龋齿致病菌之一的 *C. albicans* 抑菌效果的研究还处于初级阶段。

目前, 常用的植物黄酮提取方法主要有超声辅助提取法、热水浸提法、有机溶剂萃取法、酶辅助提取法和双水相萃取法。其中, 热水浸提法、有机溶剂萃取法、酶辅助提取法和双水相萃取法普遍存在提取率低、溶剂消耗大和溶剂污染的问题<sup>[11]</sup>, 而超声辅助提取法具有提取率高、适用范围广、安全性好等优点, 是提取黄酮的主要方法。为了更好地保留超声辅助提取法的优点, 同时填补桂花黄酮对 *C. albicans* 的抑菌效果与其品种之间关系的空白, 本文选用金桂、银桂、丹桂和四季桂为原料, 探究超声提取法、超声辅助酶提取法和超声辅助双水相提取法对桂花黄酮提取率的影响, 并选择提取率最高的方法进行工艺优化, 采用高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 确定其单体组分, 确定 4 个品种桂花中黄酮的含量及单体成分的差异; 测定 4 种

桂花黄酮对 *C. albicans* 的最小抑菌浓度 (MIC) 及其对细胞膜通透性以及生物膜形成的影响, 以期探究桂花黄酮对 *C. albicans* 抑菌活性及构效关系和不同品种桂花的栽培及应用提供参考。

## 1 实验部分

### 1.1 材料、试剂与仪器

金桂、银桂、丹桂、四季桂, 产地为湖北省咸宁市, 经南京林业大学国际木犀 (桂花) 属植物栽培品种登录中心的专家进行各桂花品种鉴定, 经  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  真空冷冻干燥 48 h 后, 磨粉过 60 目筛, 密封, 置于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中备用; *C. albicans* (BNCC336485), 河南省北纳生物检验检测有限公司; 沙式液体培养基 (HB0253-71, SDB)、沙式琼脂培养基 (HB0253-81, SDA), 青岛海博生物技术有限公司; Roswell Park Memorial Institute-1640 培养基 (RPMI-1640), 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; 芦丁 (质量分数  $\geq 98\%$ )、齐墩果酸 (质量分数  $\geq 98\%$ )、纤维素酶 (50 U/mg), 上海源叶生物科技有限公司; 无水乙醇, AR, 无锡市亚盛化工有限公司;  $\text{NaNO}_2$ 、 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 、 $\text{NaOH}$ 、二甲基亚砜 (DMSO)、磷酸二氢钾, AR, 国药集团化学试剂有限公司; 苯酚, AR, 广东光华科技股份有限公司; 浓硫酸 (质量分数 98%), 丙酮, AR, 南京化学试剂有限公司; 总蛋白定量测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所。

TG16A-WS 型高速离心机, 济南鑫贝生物技术有限公司; RE-52A 型真空旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; SpectraMax i3x 型酶标仪, 美国美谷分子仪器有限公司; Agilent 1100 型高效液相色谱仪, 安捷伦科技 (中国) 有限公司; AB SCIEX QTRAP 4500 型液质联用仪, 美国应用生物系统公司; UV-1200 型紫外-可见分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; 雷磁 DDS-307A 型电导率仪, 上海仪电科学仪器股份有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 桂花黄酮的提取

通过前期实验得知, 采用超声提取、超声辅助酶提取和超声辅助双水相提取 3 种方法提取桂花黄酮的过程中, 4 种桂花黄酮的提取率均为金桂 > 丹桂 > 四季桂 > 银桂, 因此, 选取金桂进行提取方法的筛

选及后续提取工艺的优化。

超声提取法: 取 2.0 g 桂花粉末, 置于 100 mL 锥形瓶内, 按照液固比 20 mL/g 加入体积分数为 60% 的乙醇水溶液, 置于超声波清洗机中, 超声 (200 W) 提取 60 min, 5000 r/min 离心 10 min, 过滤, 收集提取液。

超声辅助双水相提取法: 称取 35.0 g 磷酸氢二钾溶解于 45 mL 水中, 再加入无水乙醇使体系总质量为 100.0 g, 构成乙醇-磷酸氢二钾双水相体系; 取 2.0 g 桂花粉末加入上述双水相体系中振荡后混合均匀, 置于超声波清洗机中, 超声 (200 W) 提取 60 min, 5000 r/min 离心 10 min, 过滤, 分别收集上下相提取液。

超声辅助酶提取法: 将 2.0 g 桂花粉末加入 16 mL 水中, 再加入 0.32 g 纤维素酶, 搅拌下于 55 °C 酶解 30 min, 升温至 90 °C 灭活 2 min, 加入 24 mL 无水乙醇, 使乙醇最终体积分数为 60%, 置于超声波清洗机中, 超声 (200 W) 浸提 60 min, 5000 r/min 离心 10 min, 过滤, 收集乙醇提取液。

### 1.2.2 桂花黄酮含量测定

采用  $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$  比色法<sup>[12]</sup>测定桂花黄酮含量。具体步骤为: 准确称取 10.0 mg 芦丁标准品, 加入体积分数 70% 的乙醇水溶液配成质量浓度为 0.1 g/L 芦丁标准溶液; 分别量取 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 芦丁标准溶液置于 10 mL 容量瓶中, 并用体积分数为 70% 的乙醇水溶液补充至 5.0 mL; 再加入 0.5 mL 质量分数为 5% 的  $\text{NaNO}_2$  溶液, 混匀静置 6 min; 再加入 0.5 mL 质量分数为 10% 的  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  溶液, 混匀静置 6 min; 最后加入 3 mL 质量分数为 4% 的  $\text{NaOH}$  溶液, 混匀静置 15 min; 用体积分数为 70% 的乙醇水溶液定容至刻度, 混匀静置 10 min 后, 测定溶液在 510 nm 处的吸光度。根据芦丁溶液的质量浓度 ( $X$ ) 和吸光度 ( $Y$ ) 得到标准曲线方程为:  $Y=6.7493X+0.046$  ( $R^2=0.9985$ )。取桂花黄酮提取液 5.0 mL, 并以其代替芦丁标准溶液, 按照以上步骤测定其在 510 nm 处的吸光度, 根据标准曲线方程得到提取液中黄酮的质量浓度, 按下式计算桂花中总黄酮的提取率:

$$\text{提取率}/\% = \frac{\rho \times V \times V_2}{M \times V_1} \times 100 \quad (1)$$

式中:  $\rho$  为粗提取液中总黄酮的质量浓度, g/L;  $V$  为粗提取液总体积, mL;  $V_1$  为取样体积, mL;  $V_2$  为稀释体积, mL;  $M$  为桂花粉末质量, mg。

### 1.2.3 桂花黄酮提取工艺的优化

通过单因素实验和响应面实验优化桂花黄酮提取工艺。

称取 2.0 g 桂花粉末, 固定液固比 20 mL/g、温度 30 °C、超声功率 200 W, 在不同乙醇体积分数

(40%、50%、60%、70%、80%) 下提取 60 min, 研究乙醇体积分数对桂花黄酮提取率的影响。

称取 2.0 g 桂花粉末, 固定乙醇体积分数 60%、温度 30 °C、超声功率 200 W, 在不同液固比 (10、20、30、40、50 mL/g) 下提取 60 min, 研究液固比对桂花黄酮提取率的影响。

称取 2.0 g 桂花粉末, 固定液固比 20 mL/g、乙醇体积分数 60%、温度 30 °C, 在不同超声功率 (120、140、160、180、200 W) 下提取 60 min, 研究超声功率对桂花黄酮提取率的影响。

称取 2.0 g 桂花粉末, 固定液固比 20 mL/g、乙醇体积分数 60%、温度 30 °C、超声功率 200 W 下提取不同时间 (20、30、40、50、60 min), 研究超声时间对桂花黄酮提取率的影响。

称取 2.0 g 桂花粉末, 固定液固比 20 mL/g、乙醇体积分数 60%、超声功率 200 W, 在不同温度 (30、40、50、60、70 °C) 下提取 60 min, 研究温度对桂花黄酮提取率的影响。

以金桂为目标品种, 根据单因素实验结果, 选取温度、液固比、乙醇体积分数为考察因素, 以提取率为响应值, 采用响应面法进行 Box-Behnken Design (BBD) 响应面实验, 优化桂花黄酮提取的工艺条件, 其因素与水平的选择见表 1。

表 1 响应面实验因素与水平  
Table 1 Factors and levels of response surface test

因素	因素水平		
	-1	0	1
A 温度/°C	40	50	60
B 液固比/(mL/g)	10	20	30
C 乙醇体积分数/%	40	50	60

## 1.3 桂花黄酮成分分析与抑菌性能测试

### 1.3.1 成分分析

液相色谱条件: Agilent SB-C18 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm); 柱温 40 °C; 流量 0.35 mL/min; 进样量 4 μL; 流动相 A 为体积分数为 0.1% 的甲酸水溶液, B 为体积分数为 0.1% 的甲酸乙腈溶液, 按照表 2 的洗脱梯度进行洗脱。

表 2 HPLC 洗脱梯度  
Table 2 HPLC elution gradients

序号	时间/min	流动相 A 体积分数/%	流动相 B 体积分数/%
1	0	95	5
2	9	5	95
3	10	5	95
4	11	95	5
5	14	95	5

质谱条件: 电喷雾离子源 (ESI), 温度 550 °C;

离子喷雾电压 (IS) 5500 V (正离子模式) / -4500 V (负离子模式); 离子源气体 I (GS I)、气体 II (GS II) 和气帘气 (CUR) 分别为 50、60 和 25 psi; 碰撞诱导电力参数设置为高。

### 1.3.2 MIC 测定

按照响应面优化实验得到的最佳工艺提取金桂、银桂、丹桂、四季桂 4 个品种的桂花总黄酮, 收集乙醇提取液, 蒸发浓缩至无醇味, 加入预先浸泡过的大孔树脂 D101 中, 加入 3 倍体积的蒸馏水, 120 r/min 振荡吸附 24 h, 弃上清液, 再加入等体积的体积分数 70% 的乙醇水溶液 120 r/min 振荡 24 h 洗脱, 收集洗脱液, 减压蒸馏, 冷冻干燥得到桂花总黄酮粉末, 取一定量干燥后的粉末, 溶于体积分数 70% 的乙醇水溶液中, 并按照 1.2.2 节方法计算粉末中的黄酮含量。

取 0.5 mL 灭菌后的 SDB 加入 *C. albicans* 冻干粉管中, 充分溶解后再加入 SDB 稀释, 混匀后吸取少量菌液至灭菌后的 SDA 上, 涂布均匀, 置于 37 °C 培养、传代 3 次后使用。挑取 *C. albicans* 菌落, 用磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 洗涤 2 次并重悬, 使用血球计数板调整菌液浓度为  $1 \times 10^6$  CFU/mL, 备用。通过二倍肉汤稀释法对桂花不同组分进行抑菌活性测定<sup>[13]</sup>, 首先将 4 个品种桂花黄酮样品和氟康唑用少量 DMSO 溶解后作为母液, 然后用 RPMI-1640 培养基进行系列梯度稀释, 使其工作质量浓度为 62.5~3000.0  $\mu\text{g/mL}$ , DMSO 最终体积分数为 1.5%。样品分为 5 组, 分别为: 空白对照组 (200  $\mu\text{L}$  培养基)、生长对照组 (100  $\mu\text{L}$  培养基+100  $\mu\text{L}$  菌液)、阴性对照组 (100  $\mu\text{L}$  样品+100  $\mu\text{L}$  培养基)、阳性对照组 (100  $\mu\text{L}$  氟康唑+100  $\mu\text{L}$  菌液) 和实验组 (100  $\mu\text{L}$  样品+100  $\mu\text{L}$  菌液)。将上述各组分别加入 96 孔板中, 37 °C 下培养 24 h, 使用酶标仪测定 600 nm 处的吸光度, 每组实验平行进行 3 次。MIC 参考美国临床实验室标准化组织 (CLSI) 标准定义为: 与生长对照孔相比, 真菌生长被抑制 50% 的最低药物浓度。

$$\text{抑菌率} / \% = \left( 1 - \frac{\text{OD}_1 - \text{OD}_2}{\text{OD}_{\text{CK}} - \text{OD}_0} \right) \times 100 \quad (2)$$

式中:  $\text{OD}_1$  为各实验组的吸光度;  $\text{OD}_2$  为各阴性对照组的吸光度;  $\text{OD}_{\text{CK}}$  为生长对照组 (CK) 的吸光度;  $\text{OD}_0$  为空白对照组的吸光度。

### 1.3.3 细胞膜完整性测定

用灭菌后的 PBS (pH 7.4) 将 4 个品种桂花黄酮样品稀释至 MIC 值对应浓度, 稀释 *C. albicans* 菌悬液浓度为  $1 \times 10^6$  CFU/mL。实验分为 2 组, 在锥形瓶中进行, 分别为: 对照组 (6 mL PBS+6 mL 菌液) 和处理组 (6 mL 样品+6 mL 菌液)。将锥形瓶置

于 37 °C、120 r/min 下振荡, 分别在 0、3、6、9、12 和 24 h 取样, 将悬浮液以 8000 r/min 离心 10 min, 保留上清液, 测其电导率<sup>[14]</sup>, 并绘制电导率变化曲线; 测定上清液在 260 nm 处的吸光度 ( $\text{OD}_{260}$ ), 用于检测核酸泄漏<sup>[15]</sup>; 并使用 2,2-联喹啉-4,4-二甲酸钠 (BCA) 试剂盒测定蛋白质量浓度<sup>[16]</sup>。蛋白泄漏量 ( $\mu\text{g/mL}$ ) 按下式计算:

$$\text{蛋白泄漏量} = \frac{\text{OD}_s - \text{OD}_0}{\text{OD}_{\text{标}} - \text{OD}_0} \times \rho_{\text{标}} \times N \quad (3)$$

式中:  $\text{OD}_s$  为各处理组的吸光度;  $\text{OD}_0$  为空白对照组的吸光度;  $\text{OD}_{\text{标}}$  为蛋白标准品的吸光度;  $\rho_{\text{标}}$  为蛋白标准品的质量浓度, 524  $\mu\text{g/mL}$ ;  $N$  为稀释倍数。

### 1.3.4 体外抗生物膜能力测定

采用甲基四氮盐 (XTT) 比色法测定桂花黄酮对不同时间段 *C. albicans* 形成的生物膜的作用<sup>[17]</sup>。在避光条件下配制浓度为 1 mmol/L 的甲萘醌丙酮溶液, 加入 PBS 将其稀释 10 倍, 混匀, 在避光条件下加入 10 mg XTT 粉末, 充分混匀, 得到 XTT-甲萘醌溶液, 0.22  $\mu\text{m}$  孔径过滤器过滤除菌, 备用。

用 RPMI-1640 培养基将 4 个品种桂花黄酮样品稀释至 MIC 值对应浓度, 稀释 *C. albicans* 菌悬液浓度为  $1 \times 10^6$  CFU/mL。在 96 孔板中加入 200  $\mu\text{L}$  菌液, 37 °C、120 r/min 下振荡培养, 分别在培养 4、8、12、24 h 后吸出上层培养基及菌液, 用 PBS 小心洗涤 2 次附壁生物膜, 去除悬浮细胞。实验分为 2 组, 分别为: 对照组 (200  $\mu\text{L}$  培养基) 和处理组 (100  $\mu\text{L}$  样品+100  $\mu\text{L}$  培养基)。再次置于 37 °C、120 r/min 下振荡培养 24 h, 吸出液体, 用 PBS 小心洗涤 2 次, 去除培养基和样品溶液, 避光加入 200  $\mu\text{L}$  XTT-甲萘醌溶液, 37 °C 孵育 3 h 后取出, 使用酶标仪于 490 nm 测溶液的 OD, 生物膜形成率按下式计算:

$$\text{生物膜形成率} / \% = \frac{\text{OD}_s}{\text{OD}_{\text{CK}}} \times 100 \quad (4)$$

式中:  $\text{OD}_s$  为各处理组的吸光度;  $\text{OD}_{\text{CK}}$  为对照组的吸光度。

### 1.3.5 统计分析

所有实验均设置 3 次重复, 结果以平均值 $\pm$ 标准差表示。使用 Analyst 1.6.3 处理质谱数据, 使用 SPSS 27.0 进行统计分析和 Duncan's 检验,  $P < 0.05$  有统计学意义。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同提取方式和提取条件对桂花黄酮提取率的影响

按 1.2.1 节进行实验, 不同提取方式得到的桂花黄酮提取率如表 3 所示, 超声提取桂花黄酮单因素

实验结果如图 1 所示。

表 3 不同提取方法下的桂花黄酮提取率

Table 3 Extraction rate of flavonoid of *O. fragrans* under different methods

方法	提取率/%
超声提取	13.03±0.11 <sup>a</sup>
超声辅助双水相提取	9.76±0.33 <sup>b</sup>
上相	9.76±0.33 <sup>b</sup>
下相	1.16±0.14 <sup>c</sup>
超声辅助酶提取	12.42±0.64 <sup>a</sup>

注: 不同字母之间表示有显著性差异,  $P < 0.05$ , 下同。

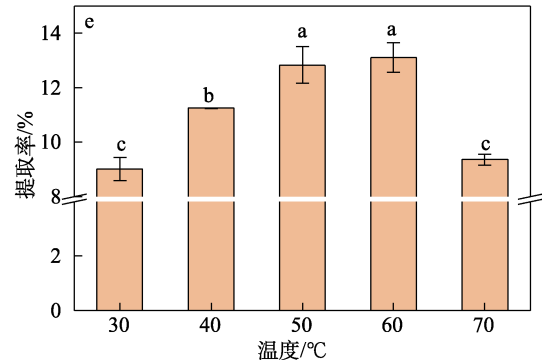
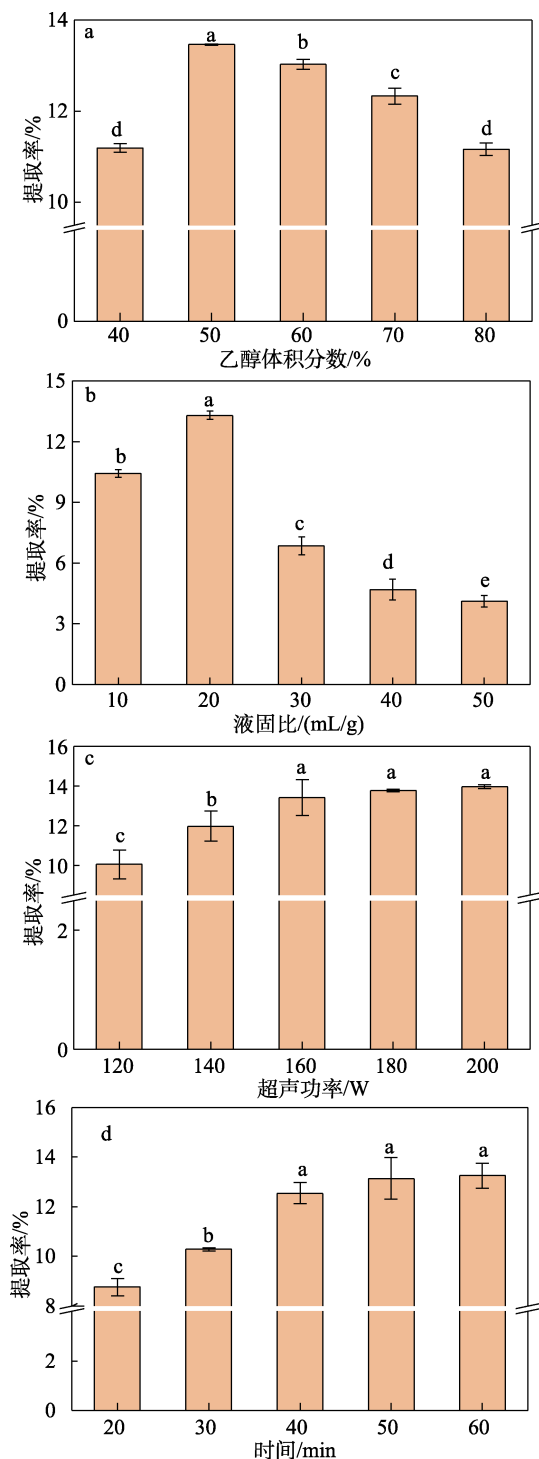


图 1 乙醇体积分数 (a)、液固比 (b)、超声功率 (c)、超声时间 (d)、温度 (e) 对桂花黄酮提取率的影响  
Fig. 1 Effects of ethanol volume fraction (a), liquid/solid rate (b), ultrasonic power (c), ultrasonic time (d), temperature (e) on extraction rate of flavonoid of *O. fragrans*

如表 3 所示, 3 种方法的提取率分别是 13.03%±0.11%、9.76%±0.33% (上相)、1.16%±0.14% (下相)、12.42%±0.64%, 其中超声提取的提取率最高, 比超声辅助双水相上相提取提高了 33.50%。但超声提取与超声辅助酶提取间没有显著性差异, 这可能与桂花表皮细胞的结构有关<sup>[18]</sup>, 桂花表皮细胞的细胞壁较薄, 无角质层, 表皮内部的基本组织也为薄壁细胞。而纤维素酶主要作用于细胞壁的纤维素, 薄壁细胞使得纤维素酶的作用位点变少, 且在超声条件下就能够被轻易破坏, 外加纤维素酶对桂花的破壁效果和内容的溶出无明显促进作用。

从图 1a 可以看出, 桂花黄酮的提取率随着乙醇体积分数的增加先增后减; 当乙醇体积分数为 50% 时, 提取率达到最大值 (13.46%); 当乙醇体积分数超过 50% 后, 提取率呈下降趋势, 这可能是由于桂花中黄酮物质与体积分数 50% 的乙醇水溶液的极性相似, 能保证更多的黄酮溶出, 当乙醇体积分数高于 50% 后, 其他有机质的溶出增多, 黄酮溶出减少, 从而导致黄酮提取率降低。从图 1b 可以看出, 当液固比在 20 mL/g 时, 桂花黄酮的提取率最高 (13.30%), 之后呈下降的趋势。这可能是由于固体含量少时, 溶剂中总黄酮浓度小, 传质阻力小, 更有利于桂花黄酮的溶出<sup>[19]</sup>。

从图 1c 可以看出, 在超声功率 120~200 W 范围内, 随着超声功率的增加, 桂花黄酮的提取率逐渐增大; 当超声功率超过 160 W 后, 提取率虽有上升, 但并无显著性差异, 可能是在此功率下桂花结构被完全破坏, 黄酮已能够充分溶出。从图 1d 可以看出, 在超声时间为 10~60 min 内, 随着超声时间的延长, 桂花黄酮提取率逐渐增大, 但超过 40 min 后, 提取率趋于平稳, 可能是由于超声时间过长, 虽有新溶出的化合物, 但还有一些化合物会被破坏

或降解，所以总体变化不大。从图 1e 可以看出，随着温度的升高桂花黄酮的提取率先增加后降低；当提取温度为 60 °C 时提取率达到最大值（13.11%），且提取温度 50 与 60 °C 时没有显著差异；当提取温度超过 60 °C 后，桂花黄酮的提取率降低。这可能是由于适当升高温度有利于促进黄酮类化合物的溶解，但温度过高可能会使得黄酮类化合物氧化分解和溶剂挥发，从而降低了黄酮提取率。考虑到黄酮的活性稳定，选择提取温度为 50 °C 较适宜。

## 2.2 超声辅助提取桂花黄酮响应面分析

### 2.2.1 回归模型的建立

选取提取率作为超声辅助提取桂花黄酮的响应值，BBD 实验结果见表 4，进一步对回归模型进行方差分析，结果见表 5。

表 4 BBD 法对桂花总黄酮提取条件的优化

Table 4 Optimization of extraction conditions of flavonoid of *O. fragrans* by BBD method

序号	A	B	C	提取率/%
1	-1	-1	0	9.39
2	1	-1	0	10.23
3	-1	1	0	9.32
4	1	1	0	6.75
5	-1	0	-1	5.80
6	1	0	-1	7.02
7	-1	0	1	11.33
8	1	0	1	7.63
9	0	-1	-1	8.55
10	0	1	-1	5.80
11	0	-1	1	10.67
12	0	1	1	7.49
13	0	0	0	13.55
14	0	0	0	13.86
15	0	0	0	13.94
16	0	0	0	12.94
17	0	0	0	13.25

表 5 回归模型方差拟合分析表

Table 5 Regression model variance fitting analysis table

因素	平方和	自由度	均方差	F 值	P	显著性
模型	138.92	9	15.44	59.02	<0.0001	**
A	2.21	1	2.21	8.45	0.0227	*
B	11.25	1	11.25	43.02	0.0003	**
C	12.38	1	12.38	47.34	0.0002	**
AB	2.91	1	2.91	11.13	0.0125	*
AC	6.06	1	6.06	23.17	0.0019	**
BC	0.05	1	0.05	0.18	0.6816	
A <sup>2</sup>	25.96	1	25.96	99.24	<0.0001	**
B <sup>2</sup>	22.31	1	22.31	85.32	<0.0001	**
C <sup>2</sup>	45.18	1	45.18	172.73	<0.0001	**
残差	1.83	7	0.26			
失拟值	1.47	3	0.49	5.34	0.0697	不显著
纯误差	0.37	4	0.09			
总误差	140.76	16				

注：“\*”表示  $P < 0.05$ ，说明差异显著；“\*\*”表示  $P < 0.01$ ，说明差异极显著。

由表 4 可知，BBD 实验中，超声辅助提取桂花黄酮的提取率为 5.80%~13.94%。如表 5 所示，在此模型中， $F$  值为 59.02， $P < 0.0001$ ，表明该模型极显著，误差小。决定系数 ( $R^2$ ) 为 0.9870，调整系数 ( $AdjR^2$ ) 为 0.9703，表明模型预测性良好，回归模型具有较高的拟合度，实验值和预测值之间具有显著相关性。各因素相交二次项  $AB$  对提取率影响显著 ( $P < 0.05$ )， $AC$  对提取率的影响达到极显著水平 ( $P < 0.01$ )。

为了分析自变量对提取率的影响，对实验结果进行回归分析得到关于提取率 ( $Y$ ) 的二次多项式回归方程为：

$$Y = 13.71 - 0.53A - 1.19B + 1.24C - 0.85AB - 1.23AC - 0.11BC - 2.48A^2 - 2.30B^2 - 3.28C^2$$

### 2.2.2 各因素交互分析

响应面实验中三因素交互作用对桂花黄酮提取率的影响如图 2 所示。

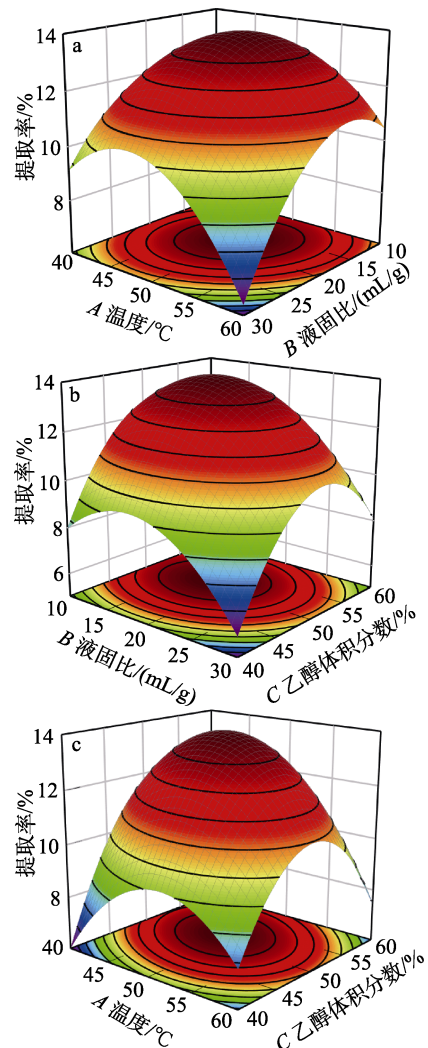


图 2 温度、液固比、乙醇体积分数对提取率的交互作用响应曲面

Fig. 2 Response surface plots of interaction effect of temperature, liquid/solid rate, and ethanol volume fraction on extraction rate

由图 2 可知, 曲线陡峭程度越大, 各因素交互作用对提取率的影响越大。由图 2a 可知, 在相同液固比下, 随着温度从 40.00 °C 升高到 47.10 °C, 桂花黄酮的提取率缓慢提高; 当温度超过 47.10 °C 后, 提取率迅速下降, 升温会使分子移动加快, 从而增加黄酮的溶解度; 同样地, 在相同温度下, 随着液固比从 10.00 mL/g 提高到 15.16 mL/g, 提取液中黄酮质量浓度降低, 提高了固液相之间的传质速率, 进而提取率逐渐提高, 并在液固比为 15.16 mL/g 时提取率达到峰值, 之后随着液固比的升高, 黄酮质量浓度下降, 提取率也迅速随之下降 (图 2b)。表明参数之间存在二次函数关系和拮抗关系, 在反应温度超过 47.10 °C 和液固比超过 15.16 mL/g 后会导致桂花黄酮产量迅速下降。温度和乙醇体积分数对提取率的影响如图 2c 所示, 当温度在 40.00~51.61 °C 内、乙醇体积分数为 40.00%~50.32% 时, 桂花黄酮提取率均随着温度或乙醇体积分数的升高而升高。

采用 Design Expert 8.0 进行参数优化, 最大限

度地提高桂花黄酮提取率, 得到的最佳提取条件为温度 48.82 °C、液固比 17.59 mL/g、乙醇体积分数 52.16%, 在此条件下, 提取率为 14.02%。考虑到实际操作情况, 调整提取温度为 50 °C、液固比为 17 mL/g、乙醇体积分数为 52% 进行 3 次重复实验, 得到桂花黄酮提取率为 13.88%±0.29%。结果表明, Design Expert 8.0 成功地优化了超声辅助提取桂花黄酮的工艺, 预测结果准确可靠。在最佳条件下提取银桂、丹桂、四季桂中的总黄酮, 提取率分别为 8.79%±0.56%、13.16%±0.33%、10.28%±0.41%。

### 2.3 桂花黄酮成分分析

采用 UPLC-MS/MS 联用技术对不同品种桂花黄酮中的成分进行测定, 并采用正、负离子模式对其进行识别, 从桂花中共鉴定出 211 种黄酮类化合物。为了比较所有检测到的物质在不同品种之间的物质含量差异, 根据代谢物保留时间与峰型的信息, 对每个物质在不同品种中检测到的质谱峰进行定量分析积分校正。表 6 列出 4 个品种桂花黄酮中相对含量较高的 10 个黄酮类化合物。

表 6 UPLC-MS/MS 鉴定桂花黄酮的主要化学成分

Table 6 Main chemical constituents of flavonoid of *O. fragrans* characterized by UPLC-MS/MS

序号	保留时间/min	m/Z	化学简式	化合物名称	相对含量/%			
					金桂	银桂	丹桂	四季桂
1	7.47	300.10	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub>	4'-羟基-5,7-二甲氧基黄烷酮	9.42	12.13	12.83	9.78
2	3.47	626.15	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub>	白麻苷	5.62	3.59	3.30	3.46
3	3.32	626.15	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub>	6-羟基山奈酚-3,6-O-二葡萄糖苷	5.47	3.88	4.27	2.91
4	3.78	610.15	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	芦丁	4.81	2.52	0.95	2.85
5	3.61	610.15	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	槲皮素-3-O-葡萄糖苷-7-O-鼠李糖苷	4.65	2.73	0.72	2.63
6	3.47	610.15	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	槲皮素-3-O-新橘皮糖苷	4.53	2.43	0.93	2.71
7	3.56	610.15	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	槲皮素-3-O-洋槐糖苷	3.85	1.83	0.69	2.29
8	2.88	464.10	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	6-羟基山奈酚-7-O-葡萄糖苷	1.89	0.33	0.16	0.35
9	4.12	578.16	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	野漆树苷	1.41	1.81	2.86	1.88
10	3.96	578.16	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	异野漆树苷	1.40	2.40	2.72	2.04

由表 4 可见, 不同品种桂花黄酮的主要成分相同, 但每种成分的相对含量有差别, 其中 4'-羟基-5,7-二甲氧基黄烷酮是每个品种中相对含量最高的一种物质, 金桂中白麻苷、6-羟基山奈酚-3,6-O-二葡萄糖苷、芦丁、槲皮素-3-O-葡萄糖苷-7-O-鼠李糖苷、槲皮素-3-O-新橘皮糖苷、槲皮素-3-O-洋槐糖苷含量比其他 3 个品种相对含量高; 丹桂中的 4'-羟基-5,7-二甲氧基黄烷酮是 4 个品种中相对含量最高的, 而芦丁、槲皮素-3-O-葡萄糖苷-7-O-鼠李糖苷、槲皮素-3-O-新橘皮糖苷、槲皮素-3-O-洋槐糖苷相对含量较其他品种低; 银桂和四季桂中各物质的相对含量较为适中。

### 2.4 桂花黄酮 MIC 分析

经大孔树脂纯化后金桂、银桂、丹桂和四季桂

总黄酮粉末中黄酮含量分别为 73.56%、72.38%、78.67% 和 82.52%, 表明样品的主要成分是黄酮。不同品种桂花黄酮及阳性对照氟康唑的 MIC 值如表 7 所示。

由表 7 可见, 不同品种的桂花黄酮对于 *C. albicans* 均有不同程度的抑菌能力。金桂、银桂、丹桂和四季桂的 MIC 值分别为 1.50、3.00、1.50 和 3.00 g/L, 平均抑菌率分别是 54.41%、51.00%、50.29% 和 59.81%。当质量浓度均为 1.50 g/L 时, 金桂、银桂、丹桂和四季桂的平均抑菌率分别是 54.41%、40.61%、50.29% 和 48.33%。由此推测抑菌效果由大到小依次是金桂>丹桂>四季桂>银桂。造成 MIC 差异的原因可能为: 一是不同品种桂花提取物中黄酮含量和提取率有差异; 二是不同品种桂花

黄酮中所含成分的相对含量有差异。因此, 后续可针对桂花黄酮成分的抑菌效果展开研究。

表 7 不同品种桂花黄酮的 MIC 值及对应抑菌率  
Table 7 MIC values and corresponding antibacterial rate of different varieties of flavonoid of *O. fragrans*

品种	MIC/(g/L)	抑菌率/%
金桂	1.50	54.41±1.27 <sup>c</sup>
银桂	3.00	51.00±0.87 <sup>d</sup>
丹桂	1.50	50.29±1.07 <sup>d</sup>
四季桂	3.00	59.81±1.28 <sup>b</sup>
氟康唑	< 0.062	75.92±1.51 <sup>a</sup>

### 2.5 桂花黄酮对白色念珠菌细胞膜的损伤效果

按照 1.3.3 节进行实验, 不同品种桂花黄酮对 *C. albicans* 细胞膜的损伤效果如图 3 所示。

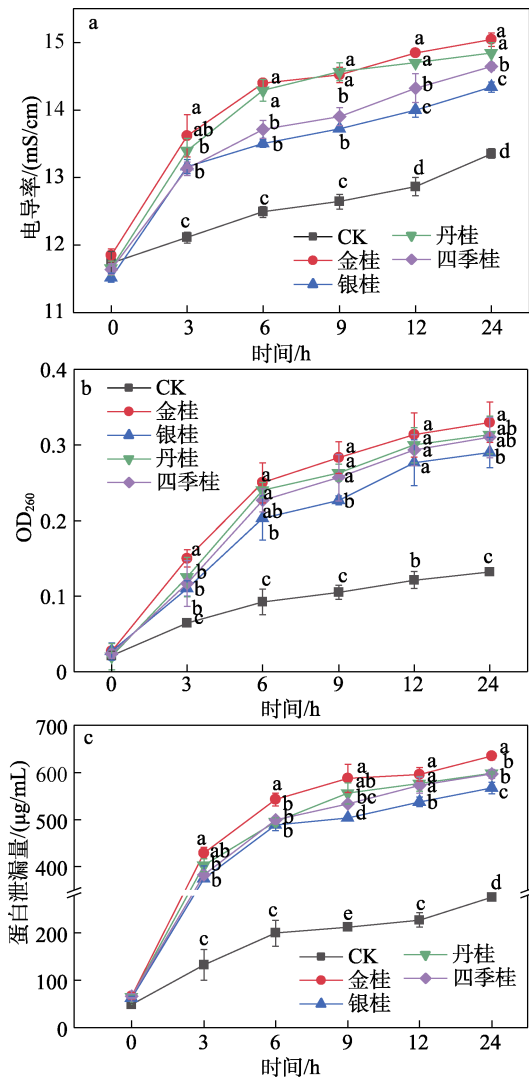


图 3 不同品种桂花黄酮对 *C. albicans* 细胞膜的损伤效果  
Fig. 3 Damage effects of different varieties of *O. fragrans* flavonoids on *C. albicans* cell membrane

细胞膜的完整性对于维持细胞活性和胞内物质至关重要, 大多数抗真菌物质的作用靶点都位于细

胞膜上<sup>[20-21]</sup>。抗菌物质作用后可能导致细胞膜通透性改变, 甚至细胞破裂, 从而导致细胞内容物泄漏, 因此, 可通过测定溶液的电导率评估质膜的通透性。如图 3a 所示, 随着时间的推移, 各组上清液的电导率逐渐增大, 但对对照组 (CK) 电导率在测定的 24 h 内均保持相对较低水平。用不同品种桂花黄酮处理过的溶液电导率在前 6 h 呈明显的增加趋势, 并在 6~24 h 内保持较慢的增加趋势。在测定的 24 h 内, 金桂和丹桂之间没有显著性差异; 处理 9 h 内, 四季桂和银桂之间没有显著性差异。对电导率的影响由大到小依次是金桂>丹桂>四季桂>银桂。结果表明, 在桂花黄酮作用后, 提高了菌体细胞膜的通透性, 细胞内核酸、蛋白和金属离子等组分可能发生泄漏, 导致菌体死亡, 因此, 进一步测定细胞内核酸和蛋白的泄漏评价细胞膜损伤程度。

利用核酸在 260 nm 处的吸收峰和蛋白与 BCA 试剂结合后在 562 nm 处的吸收峰来评价蛋白和核酸的泄漏情况, 结果如图 3b 和图 3c 所示。可以看出, 在桂花黄酮处理后 6 h 内, 核酸和蛋白泄漏量相比于对照组显著增加; 作用 24 h 时, 对照组和实验组最高的 OD<sub>260</sub> 分别为 0.132±0.004 和 0.330±0.026, 蛋白泄漏量分别为 (276.968±4.01) µg/mL 和 (634.863±8.125) µg/mL, 其变化趋势与电导率的变化趋势相似。以上结果表明, 桂花黄酮能诱导 *C. albicans* 细胞膜损伤, 导致细胞膜渗透性增加, 促进细胞内物质以 DNA 和 RNA 或细胞质蛋白的形式通过细胞膜释放, 银杏黄酮发挥抑菌效果时也有相同的作用机制<sup>[22]</sup>。

### 2.6 桂花黄酮对白色念珠菌生物膜的体外抑制效果

按照 1.3.4 节进行实验, 不同品种桂花黄酮对 *C. albicans* 生物膜的体外抑制效果如图 4 所示。

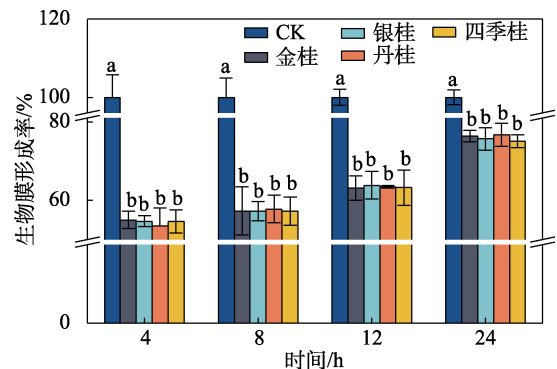


图 4 不同品种桂花黄酮对 *C. albicans* 生物膜的抑制作用  
Fig. 4 Inhibitory effects of different varieties of *O. fragrans* flavonoids on *C. albicans* biofilms

由于生物膜内部细胞能够受到膜的保护而降低或抵消宿主免疫反应和抗真菌药物的作用<sup>[23]</sup>, 因此, 由菌丝嵌入形成的 *C. albicans* 生物膜是其发挥作用



的重要方面, 与致病性和在宿主内稳定性存在密切相关, 生物膜的存在与抗药性真菌和重复感染也有很大关系<sup>[24]</sup>。本实验通过 XTT 还原法研究了桂花黄酮对生物膜早期形成的抑制作用。如图 4 所示, 与对照组相比, 不同品种的桂花黄酮对 *C. albicans* 的生物膜形成都有显著的抑制作用, 但 4 个品种之间没有显著性差异。当处理 4 h 后, 丹桂黄酮对 *C. albicans* 生物膜的抑制率最高, 可达 46.59%; 随着时间的推移, 4 种桂花黄酮对生物膜的抑制作用减弱; 处理 24 h 后, 四季桂黄酮对生物膜的抑制率最高, 为 24.85%。说明桂花黄酮可抑制早期形成的生物膜, 抑制率最高可达 46.59%; 但对于成熟生物膜的影响较弱, 其机制可能与其抑制酵母菌的菌丝转化有关, 且不同品种之间没有显著性差异。结果表明, MIC 的桂花黄酮对生物膜形成的抑制率低于抑制浮游菌, 表明抑制生物膜形成所需的桂花黄酮浓度要远高于抑制浮游菌, 显示出生物膜独特的生理现象和耐药性<sup>[25]</sup>。

### 3 结论

本文通过实验对比了桂花黄酮的 3 种提取方法 (超声提取法、超声辅助酶提取法和超声辅助双水相提取法), 得到提取率最高的方法为超声提取法, 进而通过单因素和响应面优化实验对提取工艺条件进行优化, 得到最佳条件为温度 50 °C、液固比 17 mL/g、乙醇体积分数 52%, 在该条件下, 金桂、银桂、丹桂、四季桂的提取率分别为 13.88%±0.29%、8.79%±0.56%、13.16%±0.33%和 10.28%±0.41%。UPLC-MS/MS 结果表明, 桂花黄酮中含有白麻苷、6-羟基山奈酚-3,6-*O*-二葡萄糖苷、芦丁、槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷-7-*O*-鼠李糖苷、槲皮素-3-*O*-新橘皮糖苷、槲皮素-3-*O*-洋槐糖苷等 211 种化合物。以 *C. albicans* 为研究对象, 测得不同品种桂花黄酮对 *C. albicans* 的抑菌效果, 其中金桂的抑菌效果最好, MIC 值为 1.50 g/L。对于菌体细胞膜的通透性测定显示, 在桂花黄酮处理 *C. albicans* 24 h 内, 菌体细胞的细胞膜结构遭到一定破坏, 使得电导率升高、核酸和蛋白等内容物泄漏。桂花黄酮对于初期生物膜的抑制效果较好, 其中丹桂黄酮的抑制率最高, 可达 46.59%; 到后期生物膜逐渐成熟, 抑制作用逐渐减弱。本研究为天然化合物抑制 *C. albicans* 的效果提供了参考, 下一步可研究桂花黄酮中的单体成分对 *C. albicans* 的抑制效果, 探究发挥抑菌效果的主要化合物, 并深入发掘其抑菌机制。

### 参考文献:

[1] FAKHRUDDIN K S, SAMARANAYAKE L P, EGUSA H, *et al.*

- Profuse diversity and acidogenicity of the candida-biome of deep carious lesions of severe early childhood caries (S-ECC)[J]. *Journal of Oral Microbiology*, 2021, 13(1): 1964277.
- [2] ANIL S, ANAND P S. Early childhood caries: Prevalence, risk factors, and prevention[J]. *Frontiers in Pediatrics*, 2017, 5: 157.
- [3] NDEKERO T S, CARNEIRO L C, MASUMO R M. Prevalence of early childhood caries, risk factors and nutritional status among 3~5-year-old preschool children in Kisarawe, Tanzania[J]. *Plos One*, 2021, 16(2): e0247240.
- [4] KAZEMINIA M, ABDI A, SHOHAIMI S, *et al.* Dental caries in primary and permanent teeth in children's worldwide, 1995 to 2019: A systematic review and meta-analysis[J]. *Head & Face Medicine*, 2020, 16(1): 1-21.
- [5] PITTS N B. Caries and collaborations in context[J]. *British Dental Journal*, 2021, 231(12): 737-740.
- [6] KLINKE T, KNEIST S, DE SOET J J, *et al.* Acid production by oral strains of *Candida albicans* and *Lactobacilli*[J]. *Caries Research*, 2009, 43(2): 83-91.
- [7] FU C C, XU F Y, QIAN Y C, *et al.* Secondary metabolites of *Osmanthus fragrans*: Metabolism and medicinal value[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 922204.
- [8] YU J F, LOU Q, ZHENG X Y, *et al.* Sequential combination of microwave- and ultrasound-assisted extraction of total flavonoids from *Osmanthus fragrans* Lour. flowers[J]. *Molecules*, 2017, 22(12): 2216.
- [9] CHAN B C L, IP M, GONG H, *et al.* Synergistic effects of diosmetin with erythromycin against ABC transporter over-expressed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) RN4220/pUL5054 and inhibition of MRSA pyruvate kinase[J]. *Phytomedicine*, 2013, 20(7): 611-614.
- [10] WANG J X, SHI Y, JING S S, *et al.* Astilbin inhibits the activity of sortase a from *Streptococcus mutans*[J]. *Molecules*, 2019, 24(3): 465.
- [11] SU X J (苏学军), XU Y (徐颖), ZONG C Y (宗春燕), *et al.* Research progress on extraction technology of bioactive components and total flavonoids from fig leaves[J]. *Chemical Engineer (化学工程师)*, 2023, 37(2): 62-65.
- [12] SONG H D, YANG R J, ZHAO W, *et al.* Innovative assistant extraction of flavonoids from pine (*Larix olgensis* Henry) needles by high-density steam flash-explosion[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(17): 3806-3812.
- [13] CHEN L N (陈丽楠), PENG F (彭飞), JIN C Y (靳长迎), *et al.* Extraction optimization by response surface methodology of active ingredients from chestnut burs for *Shigella dysenteriae* inhibition[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2023, 40(1): 101-108.
- [14] SUN D D, ZHANG W W, LYU M T, *et al.* Antibacterial activity of ruthenium (II) polypyridyl complex manipulated by membrane permeability and cell morphology[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2015, 25(10): 2068-2073.
- [15] CHENG X M, YANG Y, ZHU X G, *et al.* Inhibitory mechanisms of cinnamic acid on the growth of *Geotrichum citri-aurantii*[J]. *Food Control*, 2022, 131: 108459.
- [16] WANG Y, LIU X Y, CHEN T, *et al.* Antifungal effects of hinokitiol on development of *Botrytis cinerea* *in vitro* and *in vivo*[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2020, 159: 111038.
- [17] CHANDRA J, MUKHERJEE P K, LEIDICH S D, *et al.* Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic *in vitro*[J]. *Journal of Dental Research*, 2001, 80(3): 903-911.
- [18] SHANG F D (尚富德). A study on the biology of *Osmanthus fragrans* Lour.[D]. Nanjing: Nanjing Forestry University (南京林业大学), 2004.
- [19] WU X Q (吴泉琦) Study on antioxidant activity of ethanol extract of *Dictyophora*[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University (福建农林大学), 2014.
- [20] WANG W J, DENG L L, YAO S X, *et al.* Control of green and blue mold and sour rot in citrus fruits by the cationic antimicrobial peptide PAF56[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2018, 136: 132-138.
- [21] LIU S, WANG W J, DENG L L, *et al.* Control of sour rot in citrus fruit by three insect antimicrobial peptides[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2019, 149: 200-208.

(下转第 2730 页)