

基于多指标分析优化苦丁茶冬青瞬时高温灭菌工艺

张 婷, 焦连庆, 刘融融, 于 敏, 梁善芳, 张凤清

Optimize the Instantaneous High Temperature Sterilization Process of *Ilex kudingcha* Based on Multiple Index Analysis

ZHANG Ting, JIAO Lianqing, LIU Rongrong, YU Min, LIANG Shanfang, and ZHANG Fengqing

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022060219>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

灭菌和贮藏温度对荔枝汁中多酚化合物组成、含量及其抗氧化活性的影响

Effect of Sterilization and Storage Temperature on the Composition, Content and Antioxidant Activity of Polyphenol Compounds in Lychee Juice

食品工业科技. 2021, 42(11): 275-280 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020070215>

苦丁茶冬青不同萃取组分降血脂活性的比较

A comparative study on the hypolipidemic activities of various solvent extracts derived from *Ilex kudingcha* C.J.Tseng

食品工业科技. 2017(08): 330-334 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.08.056>

余甘子果渣多酚提取工艺优化及其抗氧化活性分析

Optimization of Polyphenols Extraction from *Phyllanthus emblica* L. Pomace and Its Antioxidant Activity Analysis

食品工业科技. 2019, 40(12): 171-177 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.12.028>

天浆壳多酚的提取工艺优化及其抗氧化活性评价

Optimization of extraction process of polyphenols from fruit shell of *Metaplexis japonica* (Thunb.) Makino and evaluation of its antioxidant activity

食品工业科技. 2017(22): 167-172 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.22.033>

桦褐孔菌黄酮类化合物的提取工艺优化及抗氧化活性

Optimization of extracted process of flavonoids from *Inonotus obliquus* and evaluation of antioxidant activity

食品工业科技. 2018, 39(12): 171-176 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.12.030>

刺果番荔枝叶多酚提取工艺优化及其体外抗氧化活性

Optimization of Extraction Process of Polyphenols from *Annona squamosa* Leaves and Its Antioxidant Activity *in Vitro*

食品工业科技. 2020, 41(20): 162-168 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.20.026>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

张婷, 焦连庆, 刘融融, 等. 基于多指标分析优化苦丁茶冬青瞬时高温灭菌工艺 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(8): 205–211. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022060219

ZHANG Ting, JIAO Lianqing, LIU Rongrong, et al. Optimize the Instantaneous High Temperature Sterilization Process of *Ilex kudingcha* Based on Multiple Index Analysis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(8): 205–211. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022060219

· 工艺技术 ·

基于多指标分析优化苦丁茶冬青瞬时 高温灭菌工艺

张 婷^{1,2}, 焦连庆^{2,*}, 刘融融^{2,3}, 于 敏², 梁善芳⁴, 张凤清^{1,*}

(1. 长春工业大学化学与生命科学学院, 吉林长春 130102;

2. 吉林省中医药科学院, 吉林长春 130012;

3. 吉林农业大学中药材学院, 吉林长春 130118;

4. 北京宝德润生健康管理有限公司, 北京 102200)

摘 要: 基于多指标优化苦丁茶冬青瞬时高温灭菌工艺参数。采用正交设计多指标综合加权评分法优化苦丁茶冬青瞬时高温灭菌工艺参数, 以灭菌温度、灭菌时间、药材粒度为考察因素, 以灭菌率、1,1-二苯基-2-苦基肼 (DPPH·) 抗氧化活性 IC_{50} 值、多酚类化合物含量为考察指标, 采用直观及方差分析结果评价灭菌对 3 个考察指标的影响; 采用指纹图谱技术对灭菌前后的样品进行评价。结果表明, 灭菌温度是具有显著影响的因素 ($P < 0.05$), 确定的最佳灭菌工艺条件为: 灭菌温度 160 °C, 灭菌时间 10 s, 粉碎粒度 24 目。瞬时高温灭菌对 DPPH· 抗氧化活性 IC_{50} 值以及多酚类化合物含量均无显著影响 ($P > 0.05$)。按优化工艺灭菌后的 3 批样品微生物限度检查均符合药典规定; 灭菌后 3 批样品的 DPPH· 抗氧化活性 IC_{50} 值较灭菌前减少 0.19, 多酚类化合物含量较灭菌前增加约 0.14%; 灭菌前后 3 批样品的 DPPH· 抗氧化活性 IC_{50} 值及多酚类化合物含量结果经 t 检验均无显著差异 ($P > 0.05$); 灭菌前后样品指纹图谱相似度 > 0.9 。综上所述, 瞬时高温灭菌对苦丁茶冬青质量无影响, 为瞬时高温灭菌技术在苦丁茶冬青灭菌中的应用提供了实验依据。

关键词: 苦丁茶冬青, 瞬时高温灭菌, 正交设计, 灭菌率, 抗氧化活性, 多酚类化合物

中图分类号: TQ460.6[†]

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2023)08-0205-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022060219



本文网刊:

Optimize the Instantaneous High Temperature Sterilization Process of *Ilex kudingcha* Based on Multiple Index Analysis

ZHANG Ting^{1,2}, JIAO Lianqing^{2,*}, LIU Rongrong^{2,3}, YU Min², LIANG Shanfang⁴, ZHANG Fengqing^{1,*}

(1. College of Chemistry and Life Sciences, Changchun University of Technology, Changchun 130102, China;

2. Jinlin Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130012, China;

3. College of Chinese Medicinal Material, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

4. Beijing Baode Runsheng Health Management Co., Ltd., Beijing 102200, China)

Abstract: To optimize the instantaneous high-temperature sterilization process parameters of *Ilex kudingcha* based on multiple indicators. The process parameters of instantaneous high-temperature sterilization of *Ilex kudingcha* were optimized by using the orthogonal design multi-index comprehensive weighted scoring method. Sterilization temperature, sterilization time, and particle size of herbs were used as the investigating factors, the sterilization rate, IC_{50} value of antioxidant activity of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH·), and polyphenolic content were used as indicators, visual and

收稿日期: 2022-06-24

基金项目: 吉林省科技发展规划项目 (20200404092YY); 吉林省发展和改革委员会 (2020C032-6)。

作者简介: 张婷 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物及功能食品开发, E-mail: 1821594382@qq.com。

* 通信作者: 焦连庆 (1965-), 男, 博士, 副所长, 研究员, 研究方向: 天然药物化学及代谢研究, E-mail: jiaolq2017@163.com。

张凤清 (1967-), 女, 硕士, 教授, 研究方向: 天然产物及功能食品开发, E-mail: 1044424827@qq.com。

ANOVA results were used to evaluate the effect of sterilization on the three examined indicators. Fingerprint technology was used to evaluate the samples before and after sterilization. The results showed that sterilization temperature was a factor that had a significant impact ($P < 0.05$), and the optimal sterilization process conditions were as follows: Sterilization temperature 160 °C, sterilization time 10 s, grinding size 24 mesh. No significant effect of instantaneous high-temperature sterilization on IC_{50} values of DPPH· antioxidant activity and content of polyphenolic compounds ($P > 0.05$). The microbiological limits of the three batches of samples sterilized by the optimized process were all in accordance with the provisions of pharmacopoeia. The IC_{50} values of DPPH· antioxidant activity of the three batches of samples after sterilization decreased by 0.19 and the polyphenolic content increased by about 0.14% compared to that before sterilization. The results of DPPH· antioxidant activity IC_{50} values and polyphenolic compounds content of the three batches of samples before and after sterilization were not significantly different by t -test ($P > 0.05$). The similarity of sample fingerprint before and after sterilization was > 0.9 . In conclusion, instantaneous high temperature sterilization had no effect on the quality of *Ilex kudingcha*, which would provide experimental basis for the application of instantaneous high temperature sterilization technology in *Ilex kudingcha* sterilization.

Key words: *Ilex kudingcha*; instantaneous high temperature sterilization; orthogonal design; sterilization rate; antioxidant activity; polyphenols

苦丁茶(*Ilex kudingcha* C.J. Tseng)为冬青科冬青属乔木植物,是药、饮兼用之名贵珍品^[1-2],主要含有三萜及其苷类、咖啡酰奎宁酸类、黄酮类等多种有效成分^[3-8]。苦丁茶冬青中的多酚不同于传统意义上的茶多酚,主要以咖啡酰奎宁酸类化合物为主,占多酚总量的 95%,其次是黄酮类化合物。现代药理研究表明,苦丁茶冬青具有抗氧化、降血糖、降血脂等功效^[9-15]。苦丁茶冬青作为直饮茶,其微生物水平直接关乎饮用者的健康安全。茶叶在生长、采摘、加工、运输及仓储过程中存在潜在的真菌污染^[16-18],给使用者健康造成严重威胁。苦丁茶灭菌时必须结合其有效成分及活性等综合因素选择灭菌方法^[19-20],尤其是对真菌(霉菌、酵母菌)的有效杀灭要重点考虑,同时灭菌对其多酚类化合物含量及抗氧化活性的影响也值得关注。有关苦丁茶冬青灭菌工艺方面的研究,尤其是对其灭菌后质量的研究还未见报道。

目前实际生产采用的灭菌方式有干热灭菌、湿热灭菌、环氧乙烷灭菌、钴 60 辐照灭菌、乙醇蒸汽灭菌等^[21],这些方式均存在不同程度的缺点和问题,干热灭菌破坏药物的有效成分,影响疗效;湿热灭菌后药物板结成块,影响使用;环氧乙烷有机溶剂残留;钴 60 辐照放射性残留;乙醇蒸汽能耗大、时间长,影响经济效益^[22]。瞬时高温灭菌(High Temperature Short Time, HTST)是利用直接蒸汽或热交换器,使食品、药品等在 150~180 °C 温度下保持几秒至十几秒灭菌,因其灭菌时间短,能够更大限度的保持粉粒有效成分,无环境污染,在中药产品及食品灭菌中具有良好的应用前景。尚海滨等^[23]研究表明,瞬时高温灭菌在达到灭菌效果的同时对黄芩质量无影响,但其只是以黄芩苷单一质量标准作为评价,并未从多个角度进行全方位评价,有关瞬时高温灭菌工艺优化方面的研究还未见报道。

本研究以苦丁茶冬青干燥叶为原料,采用瞬时高温灭菌技术,以正交设计多指标综合评分法优化苦丁茶冬青瞬时高温灭菌工艺参数,选取灭菌率、

DPPH·抗氧化活性 IC_{50} 值和多酚类化合物含量作为考察指标,多维度评价瞬时高温灭菌工艺对苦丁茶冬青质量的影响,以期瞬时高温灭菌技术在食品及药品领域更广泛的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

苦丁茶冬青干燥叶 购自海南省澄迈万昌苦丁茶场,经吉林省中医药科学院南敏伦研究员鉴定为冬青科冬青属苦丁茶冬青;新绿原酸、绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C、隐绿原酸、咖啡酸、异槲皮素、对羟基肉桂酸 HPLC $>98\%$,成都瑞芬思生物科技有限公司;芦丁 HPLC $>91.9\%$,中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈 色谱纯,美国 TEDIA 公司;磷酸 色谱纯,吉林省军区化工厂;DPPH·试剂 纯度 $\geq 98.5\%$,上海麦克林生化科技有限公司;其他试剂 均分析纯。

WS-FMD15 过热蒸汽瞬时灭菌系统 长春钴智制药有限公司;LC-20A 高效液相色谱仪 日本岛津公司;BT25S 型十万分之一电子天平 德国赛多利斯科学仪器有限公司;UV-1801 紫外分光光度计 北京瑞利分析仪器公司;KQ-500E 超声清洗仪 昆山市超声仪器有限公司;FW177 型高速万能粉碎机 北京市永光明医疗仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 灭菌样品制备 取苦丁茶冬青,粉碎成 24、50、80 目的颗粒备用,采用 PE 自封袋分装成 9 袋,每袋 200 g,按照正交因素水平表对 9 袋样品进行瞬时高温灭菌,用无菌采样袋分装灭菌后的样品。

1.2.2 瞬时高温灭菌工艺优化 采用正交试验法,根据瞬时高温灭菌的实践经验及设备的控制范围及前期预实验经验,选取灭菌温度(A)、灭菌时间(B)和粉碎粒度(C)为考察因素,每个因素设定 3 个水平,因素水平见表 1。以微生物限度、DPPH·抗氧化活性 IC_{50} 值及多酚类化合物含量为考察指标,综合评分法确定苦丁茶冬青瞬时高温灭菌工艺参数。

表 1 正交试验因素水平设计
Table 1 Factor level design of orthogonal experiment

编号	A 灭菌温度(℃)	B 灭菌时间(s)	C 粉碎粒度(目)
1	150	5	24
2	160	7	50
3	170	10	80

1.2.3 微生物限度检查 取灭菌前后样品 10 g, 加入 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 100 mL 混匀即为 1:10 供试液, 依次进行 10、100、1000 倍系列稀释。需氧菌总数、霉菌和酵母菌、大肠埃希菌和沙门菌及耐胆盐革兰阴性菌总数的检测按照 2020 年版《中国药典》四部通则 1105 非无菌产品微生物限度检查:微生物计数法^[24], 并计算灭菌率^[25]。

样品菌总数 = 样品细菌总数 + 霉菌及酵母菌总数

灭菌率 = (未灭菌样品菌总数 - 灭菌样品菌总数) / 未灭菌样品菌总数 × 100

1.2.4 DPPH·抗氧化活性测定 参照文献 [26–29] 的方法并加以改进, 制成药材质量浓度为 3.6、3.0、2.4、1.8 g/L (药材) 的浓度系列的苦丁茶冬青 70% 乙醇溶液, 在紫外-可见分光光度计 517 nm 波长下分别测定空白样品溶液、对照样品溶液及供试品溶液吸光度, 计算自由基清除率。以样品浓度为横坐标, 自由基清除率为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程, 得出 IC₅₀(mg/mL)值。

DPPH·自由基清除率(%) =
[1 - (A样品 - A样品对照) / A对照] × 100

1.2.5 高效液相色谱法(HPLC)测定灭菌前后 10 种多酚类化合物的含量

1.2.5.1 对照品溶液的制备 精密称定 10 种多酚对照品各 5 mg, 置于 10 mL 的量瓶中, 用 70% 乙醇溶解, 稀释至刻度, 混匀备用。

1.2.5.2 供试品溶液的制备 分别称取灭菌前后苦丁茶冬青 1 g, 各置于 50 mL 量瓶中, 加 70% 乙醇定容, 40 KHz 超声提取 65 min, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

1.2.5.3 色谱条件 色谱柱为 Agilent 色谱柱(HC-C₁₈, 4.6 mm×250 mm); 流动相为 0.2% 磷酸乙腈(A)–0.2% 磷酸水(B); 二元梯度洗脱条件: 0~6 min, 87%B; 6~16 min, 85% B; 16~30 min, 70%B。总流速为 1.0 mL/min; 柱温 40 ℃, 检测波长 320 nm, 进样量 5 μL^[29]。

1.2.5.4 多酚类化合物含量测定 分别精密吸取对照品溶液及供试品溶液各 5 μL, 注入高效液相色谱仪, 测定即得。按公式计算含量。

$$\text{多酚类化合物含量(\%)} = \frac{\frac{A_{\text{样}}}{A_{\text{对}}} \times \frac{C_{\text{对}} \times V_{\text{对}}}{V_{\text{供}}} \times V_{\text{供定}}}{W_{\text{供}} \times 1000} \times 100$$

式中: A: 峰面积; C_对: 对照品浓度(mg/mL); V_供:

供试品进样体积(μL); V_对: 对照品进样体积(μL); V_{供定}: 供试品定容体积(mL); W_供: 供试品称量(g)。

1.2.6 正交试验分析方法 按照 L₉(3⁴)正交设计表的条件进行试验, 分别测定计算样品灭菌率、DPPH·抗氧化活性 IC₅₀ 值以及多酚类化合物的含量。采用综合加权评分法评价灭菌工艺^[30–31], 权衡各指标对工艺的贡献, 设定指标 A₁(灭菌率)的权重为 35%, 指标 B₂(DPPH·抗氧化活性 IC₅₀ 值)的权重为 35%, 指标 C₃(多酚类化合物含量)的权重为 30%, 以综合指标进行方差分析。

计算综合评分 = A_i/A_{max}×0.35+B_i/B_{max}×0.35+C_i/C_{max}×0.30, 以综合评分值进行直观分析。

1.2.7 HPLC 指纹图谱的建立 指纹图谱及对照指纹图谱的采集^[26], 按最佳灭菌工艺条件处理 10 个不同批次样品, 按“1.2.5”项下对照品、供试品溶液制备方法 & 色谱条件操作分析, 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)处理, 得 HPLC 指纹图谱。

1.3 数据处理

实验数据采用 Latin 软件进行正交分析, 采用 SPSSAU 软件进行 CRITIC 权重计算, 采用 SPSS22.0 软件进行方差分析及 t 检验, P<0.05 表示具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 正交试验多酚类化合物含量测定

9 组正交试验瞬时高温灭菌的苦丁茶冬青多酚类化合物含量结果如表 2。

表 2 正交试验苦丁茶冬青 10 种多酚类化合物含量(%)
Table 2 Content of ten polyphenolic compounds of *Ilex kudingcha* by orthogonal test (%)

指标	1号	2号	3号	4号	5号	6号	7号	8号	9号
新绿原酸	0.23	0.22	0.18	0.22	0.26	0.26	0.23	0.23	0.25
绿原酸	1.32	1.16	1.13	1.22	1.33	1.33	1.30	1.32	1.29
隐绿原酸	0.36	0.25	0.22	0.25	0.34	0.34	0.33	0.35	0.31
咖啡酸	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
对羟基肉桂酸	0.17	0.14	0.00	0.23	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21
芦丁	0.01	0.00	0.08	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
异槲皮素	0.03	0.05	0.02	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
异绿原酸B	0.12	0.11	0.14	0.12	0.13	0.16	0.12	0.13	0.13
异绿原酸A	0.40	0.35	0.35	0.42	0.41	0.40	0.40	0.38	0.40
异绿原酸C	0.27	0.22	0.27	0.02	0.25	0.29	0.25	0.27	0.27
总含量	2.92	2.52	2.40	2.54	2.98	3.04	2.90	2.95	2.92

2.2 正交试验结果及分析

正交试验方差分析及直观分析结果见表 3、表 4。综合评分直观分析表明, 各因素作用主次顺序为 A>C>B, 方差分析表明灭菌温度是显著影响的因素, 因 k₂、k₃ 数值一样, 故灭菌温度选择 160、170 ℃ 均可, 结合正交表中灭菌率结果及综合评分结果, 确定最佳提取工艺为 A₂B₃C₁, 即灭菌温度为 160 ℃, 灭菌时间为 10 s, 粉碎粒度为 24 目。灭菌率、DPPH·

表 3 瞬时高温灭菌工艺 $L_9(3^4)$ 正交试验设计及结果Table 3 Orthogonal test design and results of instantaneous high temperature sterilization process $L_9(3^4)$

实验号	A	B	C	D(空白)	灭菌率(%)	DPPH·抗氧化活性 IC_{50} (mg/mL)	总多酚含量(%)	综合评分
1	1	1	1	1	66.31	8.02	2.92	0.876
2	1	2	2	2	69.96	7.45	2.52	0.824
3	1	3	3	3	77.45	7.24	2.40	0.830
4	2	1	2	3	87.74	7.17	2.54	0.878
5	2	2	3	1	90.17	6.54	2.98	0.902
6	2	3	1	2	91.91	7.35	3.04	0.950
7	3	1	3	2	88.37	6.88	2.90	0.903
8	3	2	1	3	97.72	6.47	2.92	0.921
9	3	3	2	1	91.27	6.62	2.95	0.907
灭菌率(%)	k_1	69.467	78.900	80.930	81.567			
	k_2	81.933	82.907	83.067	79.073			
	k_3	93.153	82.747	80.557	83.913			
	R	23.686	4.007	2.510	4.840			
DPPH- IC_{50} 值	k_1	7.570	7.357	7.280	7.060			
	k_2	7.020	6.820	7.080	7.227			
	k_3	6.657	7.070	6.887	6.960			
	R	0.913	0.537	0.393	0.267			
总多酚含量(%)	k_1	2.613	2.787	2.960	2.950			
	k_2	2.853	2.807	2.670	2.820			
	k_3	2.923	2.797	2.760	2.620			
	R	0.310	0.020	0.290	0.330			
综合评分	k_1	0.843	0.886	0.916	0.895			
	k_2	0.910	0.882	0.870	0.892			
	k_3	0.910	0.896	0.878	0.876			
	R	0.067	0.014	0.046	0.019			

表 4 瞬时高温灭菌工艺正交试验方差分析

Table 4 Variance analysis of orthogonal test of instantaneous high temperature sterilization process

因素		离均差平方和	自由度	均方	F值	显著性
灭菌率(%)	A	842.364	2	421.182	137.691	$P<0.05$
	B	37.408	2	18.704	6.115	$P>0.05$
	C	40.036	2	20.018	6.544	$P>0.05$
	误差	6.118	2	3.059		
DPPH· IC_{50} 值	A	1.269	2	0.063	7.372	$P>0.05$
	B	0.508	2	0.254	2.950	$P>0.05$
	C	0.169	2	0.084	0.981	$P>0.05$
	误差	0.172	2	0.086		
总多酚含量(%)	A	0.159	2	0.079	3.366	$P>0.05$
	B	0.105	2	0.052	2.226	$P>0.05$
	C	0.251	2	0.125	5.324	$P>0.05$
	误差	0.047	2	0.024		
综合评分	A	0.009	2	0.004	20.751	$P<0.05$
	B	0.003	2	0.001	6.443	$P>0.05$
	C	0.004	2	0.002	8.713	$P>0.05$
	误差	0.000	2	0.000		

注: $F_{0.05}(2,2)=19.00$, $F_{0.01}(2,2)=99.00$ 。

抗氧化活性 IC_{50} 值以及多酚类化合物含量分别的直观分析以及方差分析结果表明, 灭菌温度对灭菌率具有显著影响, 其他因素对灭菌率无显著影响, 灭菌温度、灭菌时间及粉碎粒度对 DPPH·抗氧化活性 IC_{50} 值以及多酚类化合物含量均无显著性影响。以每种化合物含量作为考察变量, 进行方差分析, 结果表明灭菌对 10 种多酚类化合物含量均无显著影响($P>0.05$), 与总含量作为考察变量结果一致。

2.3 最佳工艺参数验证

为验证优选工艺, 以最佳灭菌工艺条件处理 3 批苦丁茶冬青样品, 进行微生物限度检测、测定计算 DPPH·抗氧化活性 IC_{50} 值及多酚类化合物含量, 结果见表 5、表 6。灭菌前后样品结果经 t 检验均无显著性差异($P>0.05$), 结果见表 7, 样品抗氧化活性与多酚类化合物含量均未发生明显变化, 微生物限度均处于合格水平, 符合药典规定, 表明该工艺合理可行, 具有可操作性。

表 5 灭菌前后微生物限度考察

Table 5 Microbial limits before and after sterilization

序号	需氧菌 (CFU/g)	霉菌和 酵母菌 (CFU/g)	大肠埃希菌	耐胆盐革兰 阴性菌 (CFU/g)	沙门菌
1	1.0×10^3	8.0×10^1	未检出	<10	未检出
2	1.4×10^3	7.0×10^1	未检出	<10	未检出
3	1.1×10^3	8.0×10^1	未检出	<10	未检出
未灭菌	2.0×10^6	8.0×10^2	未检出	<10	未检出

表 6 最佳工艺验证结果

Table 6 Optimal process verification results

序号	灭菌前DPPH· 抗氧化活性 IC_{50} 值	灭菌后DPPH· 抗氧化活性 IC_{50} 值	灭菌前多酚类 化合物含量 (%)	灭菌后多酚类 化合物含量 (%)
1	6.63	6.42	4.71	4.83
2	7.15	7.07	4.53	4.64
3	7.21	6.93	4.25	4.43

表 7 灭菌前后 DPPH·抗氧化活性 IC₅₀ 值及多酚类化合物含量结果分析

Table 7 Analysis of IC ₅₀ value of DPPH· antioxidant activity and content of polyphenolic compounds before and after sterilization								
	灭菌前后	平均值	SD		<i>F</i>	<i>P</i>	<i>t</i>	自由度
DPPH·IC ₅₀ 值	灭菌前	6.9967	0.31896	假定等方差	0.018	0.899	0.704	4
	灭菌后	6.8067	0.34210					
10种多酚总含量	灭菌前	4.4967	0.23180	假定等方差	0.098	0.770	-0.77	4
	灭菌后	4.6333	0.20008					

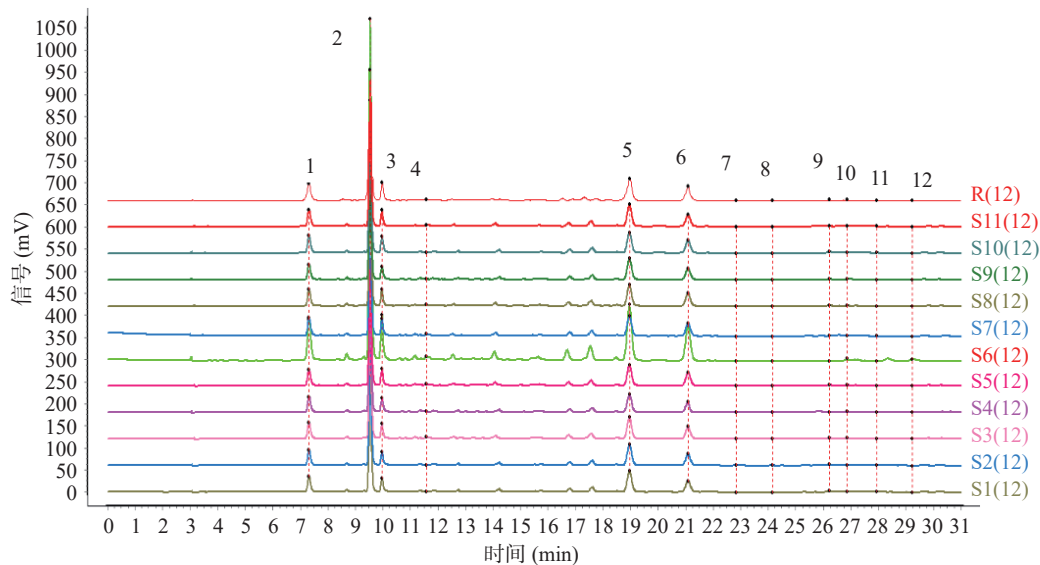


图 1 苦丁茶冬青的 HPLC 指纹图谱及对照指纹图谱

Fig.1 HPLC fingerprint and control fingerprint of *Ilex kudingcha*

注: 1.新绿原酸; 2.绿原酸; 3.隐绿原酸; 4.咖啡酸; 5.对羟基肉桂酸; 6.芦丁; 7.异槲皮素; 10.异绿原酸 B; 11.异绿原酸 A; 12.异绿原酸 C; R: 对照图谱; S1~S10: 灭菌后样品; S11: 未灭菌样品。

2.4 苦丁茶冬青灭菌前后指纹图谱

采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012 版》建立优化后最佳工艺灭菌后(S1~S10)、灭菌前(S11)批样品指纹图谱。以未灭菌样品(S11)作为参照图谱,利用中位数法进行多点校正、自动匹配(时间窗宽度为 0.10),共标定了 12 个共有峰,作为苦丁茶冬青指纹图谱的特征峰,生成对照图谱 R,即共有模式图,见图 1。将灭菌前后的样品指纹图谱与对照图谱进行比较,分别计算灭菌前后样品指纹图谱的相似度,结果均大于 0.9,表明灭菌前后苦丁茶冬青的图谱整体相貌相同,化学组成一致性良好,质量稳定。

3 结论与讨论

瞬时高温灭菌能有效降低苦丁茶冬青的微生物水平,直观及方差分析结果表明,灭菌温度对样品中微生物的水平具有显著影响,灭菌温度越高,样品微生物水平越低,而灭菌温度的变化对 DPPH·抗氧化活性和多酚类化合物含量无影响;灭菌后样品与灭菌前比较,DPPH·抗氧化实验 IC₅₀ 值平均减少 0.19,多酚类化合物含量平均增加 0.14%,可能与灭菌后水分减少 0.2%,从而使有效成分相对含量增加有关。尚海宾等^[23]研究也表明瞬时高温灭菌对同属于多酚类化合物的黄芩苷含量无影响,灭菌后样品中黄芩苷含

量比灭菌前平均增加 0.1%,灭菌后样品水分含量比灭菌前平均减少约 0.1%,这与本研究结果一致。指纹图谱标定 12 个共有峰,确认了 10 种化合物,其他两个化合物尚需采用质谱等手段进一步确认,确认的 10 种化合物单体抗氧化活性实验也需进一步研究。

参考文献

[1] 冯琳琳. 苦丁茶冬青及大叶冬青的质量控制研究[D]. 长春: 吉林大学, 2017. [FENG L L. Study on quality control of kudingcha holly and daye holly[D]. Changchun: Jilin University, 2017.]

[2] GAN R Y, ZHANG D, WANG M, et al. Health benefits of bioactive compounds from the genus *Ilex*, a source of traditional caffeinated beverages[J]. *Nutrients*, 2018, 10(11): 1682.

[3] 韦晓洁, 银慧慧, 孟菲, 等. 苦丁茶有效成分及药理活性的研究进展[J]. 中国医药导报, 2017, 14(24): 62-65. [WEI X J, YIN H H, MENG F, et al. Research progress of active components and pharmacological activities of kudingcha[J]. *China Pharmaceutical Review*, 2017, 14(24): 62-65.]

[4] 李美娟. 苦丁茶冬青化学成分及生物活性研究[D]. 长春: 吉林大学, 2018. [LI M J. Study on chemical constituents and biological activity of holly from kudingcha[D]. Changchun: Jilin University, 2018.]

- [5] 邓欣, 孟达, 张雅琼, 等. 基于超高效液相色谱-飞行时间质谱分析苦丁茶冬青皂苷类成分[J/OL]. 中药材, 2022(3): 1-10 [2023-03-14]. doi:10.13863/j.issn1001-4454.2022.03.020. [DENG X, MENG D, ZHANG Y Q, et al. Analysis of saponins from *Ilex sinensis* by ultra performance liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry[J/OL]. Chinese Medicinal Materials, 2022(3): 1-10 [2023-03-14]. doi:10.13863/j.issn1001-4454.2022.03.020.]
- [6] 倪帅帅, 焦安妮, 冯琳琳, 等. 苦丁茶冬青 HPLC-DAD-ELSD 指纹图谱研究[J]. 中草药, 2017, 48(23): 5000-5004. [NI S S, JIAO A N, FENG L L, et al. Study on HPLC-DAD-ELSD fingerprint of Kudingcha holly[J]. Chinese Journal of Herbal Medicine, 2017, 48(23): 5000-5004.]
- [7] WANG C Q, WANG L, FAN C L, et al. Illic acids A and B, two unusual triterpenes with a seven-membered ring from *Ilex latifolia*[C]//中药与天然药高峰论坛暨第十二届全国中药和天然药物学术研讨会论文集, 2012: 465. [WANG C Q, WANG L, FAN C L, et al. Illic acids A and B, two unusual triterpenes with a seven-membered ring from *Ilex latifolia*[C]// Chinese Medicine and Natural Medicine Summit Forum and the 12th National Symposium on Chinese Medicine and Natural Medicine, 2012: 465.]
- [8] WANG C Q, LI M M, ZHANG W, et al. Four new triterpenes and triterpene glycosides from the leaves of *Ilex latifolia* and their inhibitory activity on triglyceride accumulation[J]. Fitoterapia, 2015: 106.
- [9] CHEN G, XIE M, DAI Z, et al. Kudingcha and fuzhuan brick tea prevent obesity and modulate gut microbiota in high-fat diet fed mice[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2018, 62(6): 1700485.
- [10] ZHANG T T, ZHENG C Y, HU T, et al. Polyphenols from *Ilex latifolia* thunb. (a Chinese bitter tea) exert anti-atherosclerotic activity through suppressing NF- κ B activation and phosphorylation of ERK 1/2 in macrophages[J]. Medchemcomm, 2018, 9(2): 254-263.
- [11] YI R, ZHANG J, SUN P, et al. Protective effects of kuding tea (*Ilex kudingcha* C. J. Tseng) polyphenols on UVB-induced skin aging in SKH1 hairless mice[J]. Molecules, 2019, 24(6): 1016.
- [12] Chemometrics; new findings from school of pharmaceutical science in chemometrics provides new insights (Multi-component analysis of *Ilex kudingcha* C. J. Tseng by a single marker quantification method and chemometric discrimination of HPLC Fingerprints)[J]. Chemicals & Chemistry, 2018.
- [13] ZHANG H, ZOU X, HUANG Q, et al. Effects of Kudingcha nanoparticles in hyperlipidaemic rats induced by a high fat diet[J]. Cellular Physiology & Biochemistry International Journal of Experimental Cellular Physiology Biochemistry & Pharmacology, 2018: 2257.
- [14] 尹国利, 赵露, 邹成梅, 等. 超声波辅助提取苦丁茶多酚及其抗氧化与降糖活性研究[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(17): 48-55. [YIN G L, ZHAO L, ZOU C M, et al. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from kuding tea and its antioxidant and hypoglycemic activities[J]. Food Research and Development, 2020, 41(17): 48-55.]
- [15] 舒翔, 程明, 王辉, 等. 苦丁茶冬青多糖对小鼠脾脏淋巴细胞的免疫调节和抗氧化作用[J]. 食品工业科技, 2022, 43(17): 387-393. [SHU X, CHENG M, WANG H, et al. Immunomodulatory and antioxidant effects of kuding tea holly polysaccharide on mouse spleen lymphocytes[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(17): 387-393.]
- [16] 余佃贞, 武爱波. 茶叶中产毒真菌污染现状及其生物防控研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(7): 2290-2298. [YU D Z, WU A B. Current status and biological control of toxigenic fungi in tea[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2022, 13(7): 2290-2298.]
- [17] 刘文静, 黄彪, 傅建伟, 等. 超高效液相色谱—串联质谱法同时测定陈年老茶中 16 种真菌毒素残留[J]. 食品科学, 2021, 42(2): 299-305. [LIU W J, HUANG B, FU J W, et al. UPLC-MS simultaneous determination of 16 mycotoxin residues in aged tea by ultra performance liquid chromatography[J]. Journal of Food Science, 2021, 42(2): 299-305.]
- [18] 周海燕, 武爱波, 刘娜. 茶叶中真菌与真菌毒素污染风险状况与防控研究进展[J]. 中国食品卫生杂志, 2022, 34(2): 390-397. [ZHOU H Y, WU A B, LIU N. Research progress on risk status and control of fungal and mycotoxin contamination in tea[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2022, 34(2): 390-397.]
- [19] 陈少平. 常用中药灭菌技术比较及其新技术介绍[J]. 中国民族民间医药, 2013, 22(6): 104. [CHEN S P. Comparison of commonly used traditional Chinese medicine sterilization technology and its new technology introduction[J]. Chinese Ethnic and Folk Medicine, 2013, 22(6): 104.]
- [20] 冯少俊, 伍振峰, 王雅琪, 等. 中药灭菌工艺研究现状及问题分析[J]. 中草药, 2015, 46(18): 2667-2673. [FENG S J, WU Z F, WANG Y Q, et al. Research status and problems of traditional Chinese medicine sterilization process[J]. Chinese Herbal Medicine, 2015, 46(18): 2667-2673.]
- [21] 苏文俏. 天麻首乌片中生药粉灭菌工艺的研究及质量标准的提升[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2018. [SU W Q. Study on sterilization process of raw medicine powder in Tianma Shouwu tablet and improvement of quality standard[D]. Changsha: Hunan University of Traditional Chinese Medicine, 2018.]
- [22] 杨明龙. 苦荞皮层粉灭菌工艺及通便功效研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2019. [YANG M L. Study on sterilization process and laxative effect of Tartary buckwheat cortex powder[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2019.]
- [23] 尚海滨, 陶海涛, 乔晓芳. 中药高温瞬时灭菌设备的智能化设计与性能确认[J]. 流程工业, 2022(7): 58-61. [SHANG H B, TAO H T, QIAO X F. Intelligent design and performance confirmation of high temperature instantaneous sterilization equipment for traditional Chinese medicine[J]. Process Industry, 2022(7): 58-61.]
- [24] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020. [Pharmacopoeia Commission of the People's Republic of China. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (IV) [S]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020.]
- [25] 康超超, 王学成, 伍振峰, 等. 当归原生粉乙醇灭菌工艺优化

- 及其品质比较研究[J]. [中草药](#), 2019, 50(6): 1341–1347. [KANG C C, WANG X C, WU Z F, et al. Optimization of ethanol sterilization technology for angelicae sinensis radix and comparison of its quality[J]. [Chin Tradit Herb Drugs](#), 2019, 50(6): 1341–1347.]
- [26] SHARMA O P, BHAT T K. DPPH antioxidant assay revisited[J]. [Food Chemistry](#), 2009, 113(4): 1202–1205.
- [27] 冯伟红, 李春, 信伟梅, 等. 生物测定法用于中药质量评价的探索研究——以夏枯草抗氧化活性与总酚酸含量相关性的研究为例[J]. [中国中药杂志](#), 2016, 41(14): 2660–2668. [FENG W H, LI C, XIN W M, et al. Application of bioassay in quality evaluation of traditional Chinese medicine— A case study of the correlation between antioxidant activity and total phenolic acid content of *Prunella subtilis*[J]. [China Journal of Chinese Materia Medica](#), 2016, 41(14): 2660–2668.]
- [28] YANG B, ZHAO M, SHI J, et al. Effect of ultrasonic treatment on the recovery and DPPH radical scavenging activity of polysaccharides from longan fruit pericarp[J]. [Food Chemistry](#), 2008(2): 106.
- [29] 王存琴, 陈颖, 汪雷, 等. HPLC 同时测定大叶冬青叶中 10 种多酚成分的含量及抗氧化活性研究[J]. [天然产物研究与开发](#), 2019, 31(4): 557–565. [WANG C Q, CHEN Y, WANG L et al. Simultaneous determination of 10 polyphenols and their antioxidant activities in leaves of wintergreen by HPLC[J]. [Natural Products Research and Development](#), 2019, 31(4): 557–565.]
- [30] PATTAINAKORN P, CERCONEN. Integrating rough set theory and medical applications[J]. [Applied Mathematics Letters](#), 2008, 21(4): 400.
- [31] 黄定轩. 基于客观信息熵的多因素权重分配方法[J]. [系统工程理论与实践](#), 2003, 12(4): 321. [HUNG D X. Multi-factor weight allocation method based on objective information entropy [J]. [Systems Engineering-Theory & Practice](#), 2003, 12(4): 321.]