

复合茯砖袋泡茶的配方优化及安全性评价

周小露¹, 陈崇俊¹, 冉莉莎¹, 杨亚¹, 宋加艳¹, 周才碧², 傅冬和¹

(1. 湖南农业大学茶学教育部重点实验室, 湖北长沙 410128)

(2. 黔南民族师范学院生物科学与农学院, 贵州都匀 558000)

摘要: 开发一款以茯砖茶为主要原料, 以山楂、洋甘菊、陈皮等药食同源的植物材料为辅料的复合茯砖袋泡茶, 通过正交试验和感官评价得到最佳配方。以小鼠急性毒性试验为基础, 采用Ames试验、哺乳动物红细胞微核试验和体外哺乳动物类细胞染色体畸变试验的遗传毒性试验对其进行安全性评价。结果表明, 通过正交试验优化得到的最佳配方为山楂13.16%、蒲公英根13.16%、茯砖茶26.32%、薄荷叶15.79%、小茴香7.89%、陈皮13.16%、洋甘菊10.53%, 且内含成分黄酮类4.83%、多酚11.59%、氨基酸4.12%、水浸出物37.56%, 稍高于正交试验中得分前5的组合。复合茯砖袋泡茶对小鼠的最大耐受剂量大于21.285 g/(kg·bw), 相当于人体推荐剂量的507倍, 属于无毒级。此外, 在加与不加S₉混合液条件下, Ames试验和体外哺乳动物类细胞染色体畸变试验的结果均是阴性($p>0.05$), 复合茯砖茶提取物对小鼠骨髓嗜多染红细胞也无致微核作用。说明本复合茶配方无遗传毒性, 可放心饮用。

关键词: 茯砖茶; 复合茶; 袋泡茶; 急性毒性; 遗传毒性; 安全性评价

文章编号: 1673-9078(2020)04-210-219

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.4.028

Formulation Optimization and Safety Evaluation of the Compound Fuzhuan Tea Bag

ZHOU Xiao-lu¹, CHEN Chong-jun¹, RAN Li-sha¹, YANG Ya¹, SONG Jia-yan¹, ZHOU Cai-bi², FU Dong-he¹

(1. Key Lab of Tea Science of Education Ministry, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

(2. College of Bioscience and Agriculture, Qiannan Normal University for Nationalities, Duyun 558000, China)

Abstract: A compound fuzhuan tea bag was developed by using fuzhuan tea as the main raw material, with other medicinal and edible homologous plant materials such as hawthorn, chamomile and dried tangerine peel as the excipients. The optimal formula was obtained through orthogonal tests and sensory evaluation. The safety of the compound tea was assessed on the basis of acute toxicity tests, and through genetic toxicity tests including the Ames test, mammalian erythrocyte micronucleus test and *in vitro* mammalian cell chromosome aberration test. The results showed that the optimum formula was obtained through orthogonal experiments: 13.16% hawthorn, 13.16% dandelion, 26.32% fuzhuan tea, 15.79% mint leaves, 7.89% fennel, 13.16% tangerine peel and 10.53% chamomile. The optimal formula contained flavonoids 4.83%, polyphenols 11.59%, amino acids 4.12%, water extracts 37.56%, which were slightly higher than those of the combinations with the top 5 scores in the orthogonal test. The maximum tolerated dose of the compound fuzhuan tea bag in mice was higher than 21.285 g/(kg·bw), which was 507 times as much as the recommended dose for humans, thus indicating non-toxicity. In addition, the results of the Ames test and *in vitro* mammalian chromosome aberration tests were negative ($p>0.05$) in the absence and presence of S₉ mixture. The extract of the compound fuzhuan tea had no micronucleus-inducing effect on polychromatic erythrocytes of bone marrow in mice. These results showed that the compound fuzhuan tea had no genotoxicity and is safe for intake.

Key words: fuzhuan tea; compound tea; tea bag; acutetoxicity; genotoxicity; safety evaluation

引文格式:

周小露,陈崇俊,冉莉莎,等.复合茯砖袋泡茶的配方优化及安全性评价[J].现代食品科技,2020,36(4):210-219

ZHOU Xiao-lu, CHEN Chong-jun, RAN Li-sha, et al. Formulation optimization and safety evaluation of the compound fuzhuan tea bag [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(4): 210-219

收稿日期: 2019-10-01

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1604403); 湖南主要茶类优质化加工技术研究与新产品开发(2018NK2035); 长沙市科技局国际合作与交流项目(kq1706109); 都匀毛尖茶叶无公害生产技术创新团队(黔教合人才团队字[2014]45)

作者简介: 周小露(1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 茶叶加工及品质化学

通讯作者: 傅冬和(1967-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 茶叶加工及品质化学

茶叶作为一种天然饮料,因其丰富的营养价值和保健功效深受人们喜爱。茯砖茶属黑茶类的后发酵茶,经过特殊的“发花”工序^[1]形成了独特的口感风味,且富含茶多酚、黄酮、氨基酸等活性物质,具有降血糖、助消化、调理肠胃、降脂减肥、保肝护肝和抗氧化等保健功能^[2-9]。尽管如此,一直以来茯砖茶以边销茶的形式销往西北边疆地区,原料较粗老,包装形态笨拙,产品形式单一,种类不够丰富,无法吸引更多年轻的消费者。随着茶叶深加工的发展,茶饮料尤其是复合茶饮料近几年呈现出跨越式的发展,它满足了消费者对健康、时尚和便捷的需求。如罗布麻与茯茶配伍制成的罗布麻茯茶复合饮料^[10]、灵芝与红茶配伍制成的灵芝红茶复合茶饮料^[11]等。若能研发出一款风味独特且冲泡方便的复合茯砖袋泡茶,既可提供不同口味的茶饮料,又能提高茯砖茶的市场竞争力。

本课题组从《中国药典》中筛选了几种药食同源植物,以茯砖茶为主要原料,辅以山楂、薄荷、洋甘菊、陈皮、小茴香和蒲公英根配制成袋泡茶,在大量预备试验的基础上设计正交试验优化得到一款口味风格很好的理想配方。相关研究表明,山楂中含有纤维素、鞣质、三萜类、黄酮类等多种活性成分^[12,13],具有健胃消食、调节血脂、活血化瘀、抗菌等功效^[14],气味清香,滋味酸甜。薄荷为唇形科植物,味辛性温,中医常用于镇痛消炎、护肝利胆、调节消化系统等,还具有抗氧化、降血压等功效^[15]。洋甘菊为菊科的一年或多年生草本植物,其味微苦、甘香,内含黄酮类、挥发油、香豆素类等物质,具有改善失眠、祛痰止咳、降低血压和降低胆固醇等功效^[16,17],已成为众所周知的药用植物。陈皮为芸香科植物橘的成熟果皮,既可食用又可药用,中医认为,陈皮能驱寒暖胃、理气健脾、改善食欲,临床上常用于治疗心脑血管疾病、调节肠胃、抗炎、护肝、利胆等^[18,19]。小茴香富含黄酮类、氨基酸、挥发油、维生素等物质,味辛性温,既是一种调味料,又是一味重要的中药材,药理研究表明,小茴香对肝脏有保护作用^[20],对肝微粒体酶系也有影响,茴香油可以抑制病菌、促进胃液分泌、增加人体的食欲、促进消化吸收。蒲公英是菊科蒲公英属的草本植物,化学成分较复杂,主要含有黄酮类、有机酸、香豆素类、萜类、色素类等化合物,其生物活性成分对抑菌消炎、抗氧化、抗病毒、护肝利胆等具有重要作用^[21,22],某些成分还具有致敏的活性。这几种中草药和茯砖茶配制成的袋泡茶不仅口感风味独特,饮用方便、天然、健康,还赋予了袋泡茶降血脂和护肝利胆的保健功效。

尽管复合茯砖袋泡茶配方中的各材料都是药食同

源天然植物,单一材料是安全的,但配伍后的安全性没有证据,不能排除有产生毒副作用的风险。多种成分联用配伍不当可能产生毒副作用以及复合茶引起人体的有害剂量反应等问题,不能单纯地靠定性定量检测就能证明,因此,本研究依据食品安全性毒理学评价程序^[23],选择了急性经口毒性试验和 Ames 试验、哺乳动物红细胞微核试验、体外哺乳动物类细胞染色体畸变试验三项遗传毒性试验对开发的复合茯砖袋泡茶进行安全性评价,以期确定本产品为健康、安全饮品提供有力依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

受试样品:茯砖茶、山楂、洋甘菊、蒲公英根、薄荷叶、陈皮、小茴香均由长沙德康生物科技有限公司提供。

动物及饲料:SPF 健康 KM 小鼠,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司,实验动物许可证号为:SCXK(鲁)20140007,质量合格证号:No.37009200017013。饲料购自广东省医学实验动物中心,生产许可证号:SCXK(粤)2013-0002,质量合格证号:No.44200300020742。

试验菌株:TA97a、TA98、TA100、TA102 和 TA1535,美国 MOLTOX 公司;CHL 细胞株,购于中国科学院上海生命科学院研究院细胞资源中心。

1.2 仪器试剂

主要仪器:旋转蒸发仪,瑞士 Buchi 公司;超纯水仪(D8611),美国 Thermo 公司;超低温冰箱,美国 Thermo 公司;真空抽滤装置,郑州长城科工贸有限公司;紫外可见分光光度计(UV-2550PC),日本 SHIMADZU 公司;电热恒温水浴锅(DSY-2-8),北京国华医疗器械厂;电热鼓风干燥器(101-3AB),天津市泰斯特仪器有限公司;恒温培养箱(DYY-6C),北京六一;实验室常用解剖器械等。

主要试剂:磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、三氯化铝、茚三酮、氯化亚锡、葱酮等(AR),国药集团化学试剂有限公司;大鼠肝 S₉ 混合液,美国 MOLTOX 公司;丝裂霉素 C、二甲基亚砷,美国 Sigma 公司;环磷酰胺,上海源叶生物科技有限公司;小牛血清,杭州四季青生物制剂公司;2%伊红水溶液,Wellbio 等。

1.3 试验方法

1.3.1 复合茶制备及理化检测

1.3.1.1 原料预处理

选用有机的山楂、蒲公英根、茯砖茶、薄荷叶、小茴香、陈皮和洋甘菊为原料,将各原料用粉碎机粉碎过4孔和16孔的筛孔,将4孔筛面上原料再粉碎直至过4孔筛,并将16孔筛下的粉末弃掉备用。

1.3.1.2 配方优化

本研究在前期做了大量研究工作的基础上将各原料按不同比例混合拼配,采取 $L_{18}(3^7)$ 正交表进行试验设计,因素水平设定如表1所示:

表1 正交试验方案

Table 1 Orthogonal test plan

水平	A 山楂/g	B 蒲公英根/g	C 茯砖茶/g	D 薄荷叶/g	E 小茴香/g	F 陈皮/g	G 洋甘菊/g
1	5.0	5.0	10.0	4.5	2.0	3.0	3.0
2	7.5	7.5	15.0	6.0	3.0	4.0	4.0
3	10.0	10.0	20.0	7.5	4.0	5.0	5.0

1.3.1.3 感官评价

参照茶叶感官审评标准(GB/T 23776-2018),稍作修改;称取正交试验方案中的复合茯砖茶样品,充分混匀后按每个袋泡茶装 $2.0 \text{ g} \pm 0.02 \text{ g}$ 的量装入复合袋泡茶材质的小尼龙袋中,封口,组织有经验的7人审评小组进行复合茶感官审评。因是袋泡茶,且所有样品的茶汤均很清亮,所以感官评价中只以滋味和香气作为考察指标进行打分,其评分系数各为50%,取平均值。

1.3.1.4 理化检测

水浸出物采取全量法(GB/T 8305-2013)、多酚含量参照福林酚试剂法(GB/T 8313-2018)、黄酮类采取三氯化铝比色法、游离氨基酸采取茚三酮显色法(GB/T 8314-2013)、可溶性糖采取蒽酮硫酸法测定。

1.3.1.5 复合茯砖茶茶粉制备

取适量最优组合配方的复合茯砖茶样品,将其粉碎,沸水两次浸提15 min,茶水比为1:10,茶汤稍冷用双层纱布过滤,合并两次浸提茶汤再真空抽滤,用旋转蒸发器将收集的茶汤滤液减压浓缩至适当浓度,于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 预冷12 h后,真空冷冻干燥24 h,收集干粉,提取率为33%,保存于超低温冰箱备用。

1.3.2 急性毒性试验

1.3.2.1 预实验

SPF级昆明小鼠24只,雌雄各半,随机组合分成4组,每组各3只,设置四个剂量组 $710 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{bw})$ 、 $1531 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{bw})$ 、 $3300 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{bw})$ 、 $7095 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{bw})$,给每只小鼠以10 g体质量0.2 mL进行灌胃,分别在灌胃前10 h和灌胃后4 h给小鼠禁食,期间正常饮水,观察记录灌胃后的小鼠生理状况,死亡情况,摄食量和体重状况等,连续观察7 d后,发现小鼠生命体征良好,无一死亡,无法确定复合茶提取物对小鼠的半致死剂量,因此采用最大耐受量法对小鼠进行试验。

1.3.2.2 最大耐受量试验

SPF级昆明小鼠20只,雌雄各半,随机组合分成2组,对照组和处理组,雌雄分开饲养,每组各5只。称取复合茶提取物7.095 g,加入蒸馏水配制成 $7.095 \text{ g}/(\text{kg}\cdot\text{bw})$ 的剂量,每只小鼠以10 g体质量0.3 mL进行灌胃,24 h内间隔4 h灌胃3次,3次灌胃总剂量为 $21.285 \text{ g}/(\text{kg}\cdot\text{bw})$ 。对照组灌胃同样剂量的蒸馏水,连续观察14 d,记录小鼠活动状况、生理状态及死亡情况等。

1.3.3 Ames 试验

选用鼠伤寒沙门氏菌 TA97a、TA98、TA100、TA102、TA1535 五株菌株(经鉴定符合试验要求),在加与不加代谢活化物的条件下,采用平板掺入法进行试验。将受试物设置成 $5000 \text{ g}/\text{mL}$ 、 $2500 \text{ g}/\text{mL}$ 、 $1250 \text{ g}/\text{mL}$ 、 $625 \text{ g}/\text{mL}$ 、 $312 \text{ g}/\text{mL}$ 5个剂量组(分别加 S_9 和不加 S_9),同时设置溶剂对照组(灭菌水)、未处理对照组、阳性对照组(TA97a+ S_9 、TA98+ S_9 、TA100+ S_9 均加入 $10.0 \text{ g}/\text{皿}$ 2-氨基苄,TA102+ S_9 加入 $50.0 \text{ g}/\text{皿}$ 1,8-二羟基蒽醌,TA1535+ S_9 加 $3.0 \text{ g}/\text{皿}$ 二甲基亚砜;TA97a、TA98均加入 $50.0 \text{ g}/\text{皿}$ 敌克松,TA100、TA1535加 $1.5 \text{ g}/\text{皿}$ 叠氮化钠,TA102加 $4.0 \text{ g}/\text{皿}$ 丝裂霉素C)。各培养皿于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养箱培养48 h后观察结果,记录培养基上各菌株的回变菌落数。

1.3.4 哺乳动物红细胞微核试验

SPF级昆明小鼠50只,雌雄各半,体重 $25 \text{ g}\sim 30 \text{ g}$ 。将小鼠随机分成5组,每组各10只,雌雄分开饲养,设置阴性对照组、阳性对照组、复合茶提取物高剂量组 $10.0 \text{ g}/(\text{kg}\cdot\text{bw})$ 、中剂量组 $5.0 \text{ g}/(\text{kg}\cdot\text{bw})$ 和低剂量组 $2.5 \text{ g}/(\text{kg}\cdot\text{bw})$,间隔24 h给剂量组小鼠灌胃两次,阴性对照组以蒸馏水进行灌胃,阳性对照组灌胃环磷酰胺 $40.0 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{bw})$,每只小鼠以10 g体质量0.1 mL进行灌胃。于第二次灌胃后6 h采取骨髓样品,取小鼠的胸骨骨髓作稀释涂片,甲醇固定5 min,姬姆萨

染色液染色 15 min, 以 1/15 mol/L 磷酸盐缓冲液冲洗干净、晾干。用 (100×10) 倍油镜观察嗜多染红细胞的微核, 记数 (每只小鼠不少于 2000 个嗜多染红细胞), 计算小鼠骨髓微核细胞的发生率。

1.3.5 体外哺乳类细胞染色体畸变试验

在染色体畸变试验前, 用 CHL 细胞株确定受试物毒性 (试验在加与不加 S₉ 情况下进行), 根据细胞覆盖率判断受试物毒性, 覆盖率 < 50% 则有毒性。根据细胞毒性结果, 设置受试物组 625 μg/mL、312 μg/mL、156 μg/mL (加 S₉ 混合液), 312 μg/mL、156 μg/mL、78 μg/mL (不加 S₉ 混合液), 阴性对照组 (灭菌水) 和阳性对照组 (7.5 μg/mL 环磷酰胺+S₉、0.4 μg/mL 丝裂霉素 C-S₉), 细胞培养 24 h 后收获细胞, 于收获前 4 h 加秋水仙素 1.0 μg/mL。按照常规方法制片染色, 每组应分析分散良好的中期分裂相 (不少于 100 个),

每个观察细胞的染色体数在 2n±2 范围之内。

1.4 数据处理

采用 DPS 9.5 软件和 Excel 2010 对数据进行统计分析, 所有数据均以 $\bar{x} \pm \text{std}$ 表示。采用 t 检验或方差分析: 方差齐, 多组间采用单因素方差分析进行总体比较, 组间两两相比用 LSD 分析; 若方差不齐则采用 Dunnett's 检验方法进行比较分析。

2 结果与分析

2.1 复合茯砖茶感官审评及理化检测

2.1.1 感官审评分析

根据表 1 正交试验设计的复合茶样品组进行感官审评, 其结果如表 2:

表 2 复合茯砖茶感官审评评分

Table 2 Sensory evaluation score of compound fuzhuan tea

茶样编号	山楂/A	蒲公英根/B	茯砖茶/C	薄荷叶/D	小茴香/E	陈皮/F	洋甘菊/G	综合评分	香气评分	滋味评分	香气	滋味
1	1	1	1	1	1	1	1	95.00	95.00	95.00	浓, 持久	醇和
2	1	2	2	2	2	2	2	93.00	94.00	92.00	持久	酸味
3	1	3	3	3	3	3	3	95.00	96.00	94.00	浓, 持久	薄荷味浓
4	2	1	1	2	2	3	3	96.00	97.00	95.00	浓, 持久	带酸味浓
5	2	2	2	3	3	1	1	90.00	95.00	85.00	持久	欠纯
6	2	3	3	1	1	2	2	89.00	90.00	88.00	茶香显	欠醇
7	3	1	2	1	3	2	3	91.50	91.00	92.00	纯正	带酸味
8	3	2	3	2	1	3	1	92.50	94.00	91.00	有薄荷味持久	薄荷味浓
9	3	3	1	3	2	1	2	92.00	93.00	91.00	较持久	酸
10	1	1	3	3	2	2	1	95.00	94.00	96.00	薄荷味较持久	协调
11	1	2	1	1	3	3	2	93.50	90.00	97.00	尚纯	醇爽
12	1	3	2	2	1	1	3	93.00	92.00	94.00	较持久	带酸有薄荷味
13	2	1	2	3	1	3	2	93.50	95.00	92.00	持久	酸有薄荷味
14	2	2	3	1	2	1	3	93.50	95.00	92.00	持久	协调, 有薄荷味
15	2	3	1	2	3	2	1	92.00	95.00	89.00	持久	酸, 有薄荷味
16	3	1	3	2	3	1	2	93.00	95.00	91.00	持久	带酸有薄荷味
17	3	2	1	3	1	2	3	90.00	94.00	86.00	薄荷味, 持久	薄荷味浓
18	3	3	2	1	2	3	1	92.00	92.00	92.00	薄荷味	薄荷味, 蒲公英味显
k1	94.08	94.00	93.08	92.42	92.17	92.75	92.75					
k2	92.33	92.08	92.17	93.25	93.58	91.75	92.33					
k3	91.83	92.17	93.00	92.58	92.50	93.75	93.17					

依据分析结果,选择各因素(A、B、C、D、E、F和G)平均值最大的水平作为最优的配料水平,结果为A₁B₁C₁D₂E₂F₃G₃,即复合茯砖袋泡茶配方为山楂5.0 g(13.16%)、蒲公英根5.0 g(13.16%)、茯砖茶10.0 g(26.32%)、薄荷叶6.0 g(15.79%)、小茴香3.0

g(7.89%)、陈皮5.0 g(13.16%)、洋甘菊4.0 g(10.53%)。

由于试验设计中未出现该组合,因此需要进行验证试验,选取正交试验中最佳组合与总分排名前5组较优组合(即处理1、3、4、10、11)进行对比试验,结果显示如表3所示,最优组合综合评分为94分。

表3 较优复合茯砖茶配方感官审评评分

Table 3 Sensory evaluation score of better compound fuzhuan tea formula

茶样编号	香气	滋味	香气评分	滋味评分	综合评分
正交最佳配方	薄荷气浓	醇爽	94.00	94.00	94.00
1	有薄荷气	薄荷味重,酸	92.00	91.00	91.50
3	有薄荷气	醇和回甘	88.00	92.00	90.00
4	浓,薄荷气	酸,味浓	93.00	91.00	92.00
10	薄荷气低	醇	91.00	90.00	90.50
11	薄荷味不明显	酸,有薄荷味	91.00	94.00	92.50

2.1.2 理化指标分析

表4 较优复合茶配方理化指标

Table 4 Optimum physicochemical index of compound tea formula

茶样编号	黄酮类/%	可溶性糖/%	游离氨基酸/%	多酚/%	水浸出物/%
正交最佳配方	4.83±0.22 ^a	13.64±0.06 ^b	4.12±0.06 ^a	11.59±0.02 ^a	37.56±0.13 ^a
1	3.98±0.68 ^b	12.98±0.07 ^c	4.05±0.07 ^b	11.35±0.09 ^a	35.87±0.40 ^b
3	3.73±0.65 ^b	13.74±0.07 ^b	4.36±0.10 ^a	11.58±0.02 ^a	37.79±0.28 ^a
4	3.59±0.22 ^b	14.02±0.18 ^a	3.70±0.03 ^d	11.62±0.07 ^a	37.66±0.34 ^a
10	2.38±0.16 ^c	12.34±0.17 ^d	3.75±0.04 ^d	11.48±0.24 ^a	37.17±0.28 ^a
11	3.48±0.22 ^b	12.85±0.22 ^c	3.90±0.06 ^c	11.39±0.10 ^a	33.56±0.64 ^c

注:同列中含有不同字母表示组间差异显著($p<0.05$)。

根据正交试验结果,对最优配方和前5个较优配方进行主要的理化成分分析,结果如表4所示。检测6份复合茯砖茶配方,结果显示,黄酮类的含量以正交最佳配方茶样最高(4.83%±0.22%),与其他配方组合存在显著差异($p<0.05$);可溶性糖的含量以4号最高(14.02%±0.18%),正交最佳配方茶样稍低;虽然,各配方组合的多酚含量没有显著性差异($p>0.05$),但从数据上对比以4号含量最高(11.62%±0.07%),正交最佳配方茶样次之(11.59%±0.02%);各配方组合氨基酸的含量存在显著性差异($p<0.05$),以3号配方(4.36%±0.10%)含量最高,其次是正交最佳配方茶样(4.12%±0.06%),4号和10号较低;水浸出物含量各组合也存在显著性差异($p<0.05$),以3号配方(37.79%±0.28%)最高,其次为4号和正交最佳配方茶样(37.56%±0.13%)。

通过理化检测可知,正交最佳配方茶样,其黄酮类(4.83%±0.22%)、多酚(11.59%±0.02%)、氨基酸(4.12%±0.06%)、水浸出物(37.56%±0.13%)含量都稍高,且感官评价综合评分最高,滋味醇爽、香气薄荷气味浓,为确定的最优配方。

2.2 急性毒性试验

急性毒性试验是毒理学试验中评价受试物是否有毒性的一项最基本的试验,通常用LD₅₀来表示半致死剂量。根据预试,小鼠精神状态较好,无死亡,不能测出LD₅₀,因此采用最大耐受量法来进行试验。最终给小鼠灌胃的复合茯砖茶茶粉的折合剂量为21.285 g/(kg·bw),观察14 d后,小鼠无中毒和死亡现象,被毛、皮肤、消化系统、呼吸系统和神经系统等都无异常情况,解剖观察心、肝、脾、肺、肾等组织也没有明显病变。结果表明小鼠对复合茯砖茶提取物的最大致死剂量大于21.285 g/(kg·bw),相当于人体推荐量的507倍,根据急性毒性的分级标准,此复合茯砖茶属无毒级,可进行更深入的遗传毒性试验。

2.3 Ames 试验

Ames 试验是检测受试物诱发菌株的基因回复突变能力。培养结束后经观察,受试物0.312 mg/皿~5000 mg/皿各剂量组在加与不加S₉的情况下,背景生长良好,各测试菌株回变菌落数都未超过未处理对照组的

2 倍, 也无剂量-反应关系, 试验结果为阴性, 说明复 这 5 株试验菌株没有遗传毒性。试验结果详见表 5。
合茶提取物对 TA97a、TA98、TA100、TA102 和 TA1535

表 5 复合茶提取物细菌回复突变试验结果

Table 5 Test results of compound tea extract on bacterial back mutation

分组	剂量/(mg/皿)	TA97a		TA98		TA100	
		+ S ₉	-S ₉	+ S ₉	-S ₉	+ S ₉	-S ₉
复合茯砖茶茶粉	5.0	92±6	123±28	32±4	31±1	125±9	134±8
	2.5	76±13	138±20	37±2	37±1	118±8	139±13
	1.25	89±10	116±9	30±3	29±5	107±3	123±9
	0.625	93±1	120±10	31±2	36±7	119±10	133±8
	0.312	85±7	114±8	34±3	34±5	111±8	128±3
未处理对照	-	86±5	131±4	33±4	33±5	117±4	132±4
溶剂对照组	-	91±8	135±12	31±2	28±3	120±4	133±15
阳性对照组/(mg/皿)							
NaN3	1.5					685±85**	
2-AF	10.0		814±86**		942±78**		686±95**
敌克松	50.0	1049±185**		992±36**			
丝裂霉素 C	4.0						
1,8-二羟基蒽酮	50.0						
2-AA	3.0						
分组	剂量/(mg/皿)	TA102		TA1535			
		+ S ₉	-S ₉	+ S ₉	-S ₉		
复合茯砖茶茶粉	5.0	297±15	336±12	19±1	16±3		
	2.5	261±13	257±55	17±2	19±2		
	1.25	236±5	315±12	15±1	18±4		
	0.625	245±16	311±6	15±2	21±3		
	0.312	216±15	300±25	17±5	18±2		
未处理对照	-	231±16	317±11	20±3	18±3		
溶剂对照组	-	247±15	321±22	16±3	21±4		
阳性对照组/(mg/皿)							
NaN3	1.5			646±48**			
2-AF	10.0						
敌克松	50.0						
丝裂霉素 C	4.0	1938±178**					
1,8-二羟基蒽酮	50.0		894±24**				
2-AA	3.0				1006±68**		

注: “**”表示致突变阳性, 回复菌落数超过未处理对照组回复菌落数 2 倍或以上。

2.4 哺乳动物红细胞微核试验

细胞微核是评价遗传毒性的指标之一, 用于检测受试物是否引起动物骨髓或外周红细胞的染色体损伤。复合茯砖茶茶粉哺乳动物红细胞微核试验结果如表 6, 阴性对照组微核细胞率为 2.70‰和 2.40‰, 阳性对照组微核细胞率为 33.60‰和 30.50‰, 阳性对照

组微核细胞率极显著高于阴性对照组, 具有统计学差异 ($p < 0.01$), 试验系统成立。复合茯砖茶茶粉各剂量组微核细胞率 (2.00‰~2.90‰) 与阴性对照组相比, 无显著差异 ($p > 0.05$), 试验结果为阴性。而复合茯砖茶茶粉各剂量组微核细胞率极显著低于阳性对照组, 具有统计学差异 ($p < 0.01$)。因此, 可以判断复合茯茶对小鼠的骨髓嗜多染红细胞没有致微核的作用。

表6 复合茯砖茶茶粉哺乳动物红细胞微核试验结果

Table 6 Test results of compound fu tea powder on mammalian erythrocyte micronucleus

分组	剂量/(mg/kg bw)	性别	动物数	受检 PCE 数	含微核 PCE 数	微核细胞率/%	PCE/NCE/%
复合茯砖茶茶粉	10000	雌	5	10000	20	2.00±1.27	50.64±2.64
		雄	5	10000	29	2.90±0.89	50.33±2.87
	5000	雌	5	10000	25	2.50±1.27	51.18±2.27
		雄	5	10000	24	2.40±0.74	52.10±2.10
	2500	雌	5	10000	20	2.00±0.79	50.48±1.22
		雄	5	10000	28	2.80±1.15	50.88±3.07
阴性对照组	0	雌	5	10000	27	2.70±0.91	50.40±2.45
		雄	5	10000	24	2.40±0.96	50.88±3.07
阳性对照组	40	雌	5	10000	428	33.60±8.81**	47.82±5.94
		雄	5	10000	410	30.50±6.05**	52.85±2.92

注：“**”表示与阴性对照组比较达到极显著差异 ($p < 0.01$)；微核细胞率(%)与 PCE/RBC (%)均以小鼠为单位统计，表示为均值±标准差。

2.5 体外哺乳动物染色体畸变试验

复合茯砖茶茶粉与细胞接触 4 h，在加 S_9 情况下，其最终浓度 $\geq 1250 \mu\text{g/mL}$ 时细胞覆盖率 $< 50\%$ ；在不加 S_9 情况下，其终浓度 $\geq 625 \mu\text{g/mL}$ 时细胞覆盖率 $< 50\%$ ，表明复合茯砖茶在高浓度时具有细胞毒性。根据细胞毒性结果，观察分析畸变细胞数， $625 \mu\text{g/mL} \sim 156$

$\mu\text{g/mL}$ 剂量组染色体畸变细胞率与阴性对照组比较（在加 S_9 的条件下），差异无统计学意义 ($p > 0.05$)。
 $312 \mu\text{g/mL} \sim 78 \mu\text{g/mL}$ 剂量组染色体畸变细胞率与阴性对照组比较（在不加 S_9 的情况下），差异无统计学意义 ($p > 0.05$)。试验结果为阴性，说明该受试物未见致突变性。详见表 7、表 8。

表7 复合茶的细胞毒性试验结果

Table 7 Cytotoxicity test results of compound tea

剂量组	浓度	接种的细胞数/(个/孔)		细胞覆盖率/%	
		+ S_9	- S_9	+ S_9	- S_9
阳性对照组	0.2 mL	1×10^6	1×10^6	> 50	> 50
复合茯砖茶茶粉/ ($\mu\text{g/mL}$)	5000	1×10^6	1×10^6	< 50	< 50
	2500	1×10^6	1×10^6	< 50	< 50
	1250	1×10^6	1×10^6	< 50	< 50
	625	1×10^6	1×10^6	> 50	< 50
	312	1×10^6	1×10^6	> 50	> 50

表8 复合茯砖茶体外哺乳动物细胞染色体畸变试验结果

Table 8 Results of chromosomal aberration test of compound tea on mammalian cells *in vitro*

剂量组	浓度	观察细胞数/个		畸变细胞数/个		畸变细胞率/%	
		+ S_9	- S_9	+ S_9	- S_9	+ S_9	- S_9
阴性对照组	0.2 mL	100	100	2	1	2.0	1.0
复合茯砖茶茶粉/ (g/mL)	625	100	#	6	#	6.0	#
	312	100	100	5	3	5.0	3.0
	156	100	100	1	3	1.0	3.0
	78	\	100	\	2	\	2.0
	阳性对照组/ (mg/mL)	CP 7.5	100	\	32	\	32.0 ^{###}
	MMC 0.4	\	100	\	18	\	18.0

注：“#”表示细胞覆盖率 $< 50\%$ ；“\”表示不作为分析观察项；“###”表示与阴性对照组比较在 $p < 0.01$ 水平到达极显著差异。

3 讨论与结论

3.1 本试验以茯砖茶为主要原料, 辅以山楂、薄荷、洋甘菊、陈皮、小茴香等植物材料, 通过正交试验优化得到滋味和香气审评值最佳配方为 $A_1B_1C_1D_2E_2F_3G_3$, 其香气薄荷气味浓, 滋味醇爽, 综合评分为94分; 且黄酮类为4.83%、多酚为11.59%、氨基酸为4.12%、水浸出物为37.56%, 稍高于正交试验中得分前5的组合。

3.2 茯砖茶作为我国传统饮品, 饮用历史较久, 可基本认为饮用茯砖茶是安全的。相关研究表明, 茯砖茶对小鼠的急性经口毒性试验是无毒的, 遗传毒性试验结果显示阴性, 且对30 d喂养大鼠的血液及各项生长指标都在正常范围之内, 说明茯砖茶没有毒性, 可以放心饮用^[24]。本复合茯砖茶中还配有其他天然植物, 李晓宇等^[25]对薄荷不同组分进行了安全性评估, 发现薄荷水提组分的MTD值相当于70 kg人体用量的746.7倍, 按毒性分级标准, 属无毒级; 王莹等^[26]为确定洋甘菊的安全性对小鼠进行了急性毒性试验, 结果表明, 洋甘菊水提物的最大灌胃剂量相当于成年人日用量的535倍, 毒性较低; 黄文文^[27]探讨了山楂降血脂的活性成分及安全性评价, 研究表明, 山楂降血脂的作用可能是通过抑制HMG-CoA还原酶的活性实现的, 且山楂的急性毒性试验 $LD_{50} > 10 \text{ g}/(\text{kg}\cdot\text{bw})$, 属无毒级, 遗传毒性试验和长期毒性试验结果均为阴性, 说明山楂是一种安全食品。这些天然植物药材单一是安全性, 但是混合配制增加了成品茶生化成分的复杂性, 因此, 为了确定此最优配方复合茶是否符合食品安全标准, 本课题组对其进行了安全性评价。在急性经口毒性试验中, 由于无法测出小鼠的 LD_{50} , 因此采取最大耐受量MTD对小鼠进行试验, 结果表明小鼠对复合茶的最大耐受致死剂量大于 $21.285 \text{ g}/(\text{kg}\cdot\text{bw})$, 按照急性毒性的分级标准, 足以证实了此复合茯砖袋泡茶是安全无毒的。遗传毒性试验采取了体内外相结合, 对细胞染色体、基因等进行了全方面的分析。Ames试验中, 在加与不加 S_9 的条件下, 复合茶经试验菌株(TA97a、TA98、TA100、TA102和TA1535)检测, 各测试菌株回变菌落数都未超过未处理对照组的2倍, 也无剂量-反应关系, 结果为阴性, 说明此配方无遗传毒性。在哺乳动物红细胞微核试验中, 复合茯砖茶各剂量组微核细胞率与阴性对照组相比, 无显著差异($p > 0.05$), 且极显著低于阳性对照组($p < 0.01$), 提示了复合茯砖茶无致微核作用。此外, 在加与不加 S_9 的情况下, 复合茶各剂量组染色体畸变细胞率与阴性对照组比较均无统计学意义($p > 0.05$), 说明复合茶不产生致突变性。

3.3 综上所述, 通过正交试验得到的最佳配方茯砖袋泡茶经急性毒性试验和遗传毒性试验(Ames试验、哺乳动物红细胞微核试验、体外哺乳类动物染色体畸变试验)检测的结果均为阴性, 说明在本试验条件下本研究小组开发的复合茶配方产品无致突变性、没有遗传毒性, 对动物基因、细胞染色体无损害作用, 符合食品安全标准, 可放心饮用, 一般建议日饮用量不超过人体推荐量10 g。

参考文献

- [1] 孙胜利. 浅谈茯砖茶的加工发展历程[J]. 中国茶叶加工, 2018, 1: 62-63
SUN Sheng-li. A brief talk on the development of fuzhuan tea processing [J]. China Tea Processing, 2018, 1: 62-63
- [2] 樊成. 茯砖茶主要活性成分研究新进展[J]. 农产品加工, 2018, 13: 52-55
FAN Cheng. New research progress in main active ingredients of fu brick tea [J]. Farm Products Processing, 2018, 13: 52-55
- [3] 韩卓潇, 黄亚亚, 梁艳, 等. 茯砖茶降脂功能及主要降脂活性物质研究进展[J]. 广东茶业, 2017, 4: 6-11
HAN Zhuo-xiao, HUANG Ya-ya, LIANG Yan, et al. Research progress on hypolipidemic function and main lipid-lowering active substances in fuzhuan tea [J]. Guangdong Tea, 2017, 4: 6-11
- [4] Fu D, Ryan E P, Huang J, et al. Fermented camellia sinensis, fu zhuan tea, regulates hyperlipidemia and transcription factors involved in lipid catabolism [J]. Food Research International, 2011, 44(9): 2999-3005
- [5] 林勇, 刘仲华, 林海燕, 等. 茯砖茶水提物对高脂血症小鼠脂质代谢的影响及其抗氧化作用的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(5): 1561-1566
LIN Yong, LIU Zhong-hua, LIN Hai-yan, et al. Study on influence of fuzhuan brick tea aqueous extract on lipid metabolism in hyperlipidemia mice and its antioxidation [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2015, 6(5): 1561-1566
- [6] 傅冬和, 余智勇, 黄建安, 等. 不同年份茯砖茶水提取物的抑菌效果研究[J]. 中国茶叶, 2011, 33(1): 10-12
FU Dong-he, YU Zhi-yong, HUANG Jian-an, et al. Study on the antibacterial effect of water extracts from fuzhuan tea in different years [J]. China Tea, 2011, 33(1): 10-12
- [7] 吴香兰, 刘仲华, 曹丹, 等. 茯砖茶对小鼠肠道免疫功能调节作用的研究[J]. 茶叶科学, 2013, 33(2): 125-130
WU Xiang-lan, LIU Zhong-hua, CAO Dan, et al. Effects of fuzhuan brick tea on the adjustment of intestinal immune

- function in mice [J]. Journal of Tea Science, 2013, 33(2): 125-130
- [8] Du H, Wang Q, Yang X. Fu brick tea alleviates chronic kidney disease of rats with high fat diet consumption through attenuating insulin resistance in skeletal muscle [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(10): 2839-2847
- [9] 吴根梁,侯爱香,李珂,等.陈年茯砖茶多酚类对老年人肠道菌群的影响研究[J].茶叶科学,2018,38(3):319-330
WU Gen-liang, HOU Ai-xiang, LI Ke, et al. Effects of polyphenols of old fu brick tea on the elderly intestinal flora [J]. Journal of Tea Science, 2018, 38(3): 319-330
- [10] 黄英,肖海兵,陈培旭,等.罗布麻茯茶复合饮料的研制[J].塔里木大学学报,2018,30(3):24-32
HUANG Ying, XIAO Hai-bing, CHEN Pei-xu, et al. Preparation of compound beverage with *Apocynum venetum* and fuzhuan tea [J]. Journal of Tarim University, 2018, 30(3): 24-32
- [11] 刘金,方俊,谢艳华,等.灵芝红茶复合茶饮料的研制[J].现代食品科技,2017,11:191-200
LIU Jin, FANG Jun, XIE Yan-hua, et al. Preparation of compound beverage with *Ganoderma lucidum* and black tea [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 11: 191-200
- [12] 姚园,崔丽贤,刘素稳,等.山楂功能成分及加工研究进展[J].食品研究与开发,2017,15:211-215
YAO Yuan, CUI Li-xian, LIU Su-wen, et al. Research progress on functional components and processing of hawthorn [J]. Food Research and Development, 2017, 15: 211-215
- [13] 楼陆军,罗洁霞,高云.山楂的化学成分和药理作用研究概述[J].中国药业,2014,23(3):92-94
LOU Lu-jun, LUO Jie-xia, GAO Yun. Review on the chemical constituents and pharmacological effects of hawthorn [J]. China Pharmaceuticals, 2014, 23(3): 92-94
- [14] 王玲,吴军林,吴清平,等.山楂降血脂作用和机理研究进展[J].食品科学,2015,15:245-248
WANG Ling, WU Jun-lin, WU Qing-ping, et al. Research progress on hypolipidemic effect and mechanism of hawthorn [J]. Food Science, 2015, 15: 245-248
- [15] 陈智坤,梁呈元,任冰如,等.薄荷属植物挥发性成分及药理作用研究进展[J].天然产物研究与开发,2013,6:856-861
CHEN Zhi-kun, LIANG Cheng-yuan, REN Bing-ru, et al. Research progress on volatile components and pharmacological actions of genus [J]. Natural Product Research and Development, 2013, 6: 856-861
- [16] 杨俊杰.洋甘菊再生体系的建立及抗炎抑菌、抗氧化作用的研究[D].合肥:安徽农业大学,2009
YANG Jun-jie. Establishment of chamomile regeneration system and study on anti-inflammatory, antibacterial and antioxidant activities [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2009
- [17] 郭玉婷,兰卫.维药洋甘菊提取物对高脂大鼠血脂的影响[J].山东轻工业学院学报(自然科学版),2013,2:17-19
GUO Yu-ting, LAN Wei. Effect of uigur traditional herb *Matricaria chamomile* extract on serum lipid of experimental hyperlipidemia rats [J]. Journal of Shandong Polytechnic University (Natural Sciences), 2013, 2: 17-19
- [18] 官福兰,王汝俊,王建华.陈皮及橙皮甙对小鼠胃排空、小肠推进功能的影响[J].中药药理与临床,2002,3:7-9
GUAN Fu-lan, WANG Ru-jun, WANG Jian-hua. Effect of chenpi and hesperidin on gastric emptying and small intestinal propulsive function in mice [J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2002, 3: 7-9
- [19] 冯孔龙,朱晓艾,陈彤,等.川陈皮素对高脂膳食诱导大鼠的降脂减肥及预防脂肪肝形成作用[J].食品科学,2018,1: 213-220
FENG Kong-long, ZHU Xiao-ai, CHEN Tong, et al. Hypolipidemic and anti-obesity effect of nobiletin and its role in prevention of fatty liver in high fat diet-fed rats [J]. Food Science, 2018, 1: 213-220
- [20] 周世雄,甘子明,张力,等.中药小茴香对肝硬化腹水大鼠利尿作用机制实验研究[J].新疆医科大学学报,2007,1:33-35
ZHOU Shi-xiong, GAN Zi-ming, ZHANG Li, et al. Diuresis mechanism study of *Foeniculum vulgare* mill on liver fibrosis ascites in rats [J]. Journal of Xinjiang Medical University, 2007, 1: 33-35
- [21] 任丽平,杜钢军,崔新萍.蒲公英对酒精性肝损伤的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,11:179-181
REN Li-ping, DU Gang-jun, CUI Xin-ping. Study on protective effect of taraxact herba on alcohol-induced liver injury [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2011, 11: 179-181
- [22] 刘佳慧,刘阳,王冬梅.蒲公英根提取物的体内抗氧化活性[J].西北民族大学学报(自然科学版),2018,2:53-56
LIU Jia-hui, LIU Yang, WANG Dong-mei. Antioxidant activity of dandelion root extract *in vivo* [J]. Journal of Northwest Minzu University (Natural Science), 2018, 2: 53-56
- [23] 中华人民共和国卫生部.食品安全性毒理学评价程序[S]. Ministry of Health of the People's Republic of China. Food

- Safety Toxicology Evaluation Procedure [S]
- [24] 肖文军,傅冬和,任国谱,等.茯茶毒理学试验报告[J].茶叶科学,2007,27(4):307-310
XIAO Wen-jun, FU Dong-he, REN Guo-pu, et al. Study on the toxicity experiments of fuzhuan tea [J]. Journal of Tea Science, 2007, 27(4): 307-310
- [25] 李晓宇,孙蓉.薄荷不同组分对小鼠急性毒性实验比较研究[J].中国药物警戒,2012,9(2):65-68
LI Xiao-yu, SUN Rong. Experimental comparis on study on mice's acute toxicity of different composition in herba menthae [J]. Chinese Journal of Pharmacovigilance, 2012, 9(2): 65-68
- [26] 王莹,郭玉婷,陈阳,等.维药洋甘菊急性毒性实验研究[J].吉林中医药,2016,10:1036-1038
WANG Ying, GUO Yu-ting, CHEN Yang, et al. Acute toxicity of uygur medicine *Matricaria chamomilie* [J]. Jilin Journal of Traditional Chinese Medicine, 2016, 10: 1036-1038
- [27] 黄文文.山楂中抑制 HMG-CoA 还原酶的活性成分研究及其安全性评价[D].重庆:西南大学,2010
HUANG Wen-wen. Study on activity to HMG-CoA reductase and security evaluation of hawthorn fruit [D]. Chongqing: Southwest University, 2010

(上接第 149 页)

- [18] Lee S S, Lin H C, Chen C K. Acylated flavonol monorhamnosides, α -glucosidase inhibitors, from *Machilus philippinensis* [J]. Phytochemistry, 2008, 69(12): 2347-2353
- [19] 陈颖璐.亚麻种子中降糖多肽的分离纯化及性质研究[D].太原:山西大学,2017
CHEN Ying-lu. The purification and properties of the hypoglycemic peptide from flax seeds [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2017

(上接第 289 页)

- [11] Cui L Q, Cui S P, Ping M A, et al. Effect of soybean dregs powder on sensory evaluation of Chinese steamed bread (CSB) and textural properties of wheat dough and CSB [J]. Food Science, 2014, 35(5): 85-88
- [12] 李瑜,乔明武,刘国磊.醒发温湿度对馒头感官评定影响 [J].粮食与油脂,2008,2:21-23
LI Yu, QIAO Ming-wu, LIU Guo-lei. Effect of proofing temperature and relative humidity on sensory evaluation of steam bread [J]. Cereals & Oils, 2008, 2: 21-23