

2019, 45(4): 0555-0562

ISSN 0257-4799; CN 32-1115/S

DOI: 10.13441/j.cnki.cykx.2019.04.013

3 种桑叶黑茶的饮用安全性评价

邵元元^{1,2,3} 颜新培¹ 李飞鸣¹ 肖建中¹ 邹湘月¹ 李霞¹ 叶添梅¹

(¹湖南省蚕桑科学研究所,长沙 410127; ²湖南农业大学茶学教育部重点实验室,长沙 410128; ³湖南省植物功能成分利用协同创新中心,长沙 410128)

摘要 以桑叶茯砖、桑叶千两和桑叶天尖为研究对象,采用食品安全国家标准测定方法对 3 种桑叶黑茶中致病菌、重金属和农药残留进行检测,并按食品安全毒理学评价程序对桑叶黑茶进行急性毒性试验,以期探明桑叶黑茶的饮用安全性。检测结果显示,桑叶茯砖、千两、天尖 3 种黑茶样品中不含致病菌,重金属铅、镉、汞和砷的含量都远低于茶叶农业标准,同时均未检测出农药残留,符合国家标准对食品中污染物限量的要求。小鼠急性毒性试验结果显示,桑叶茯砖、千两、天尖提取物对小鼠的 LD₅₀ 分别为 22.3 g/kg、22.8 g/kg、28.5 g/kg,均大于《保健食品评价技术与规范》中规定的无毒值;灌胃 3 种黑茶提取物的小鼠脏器解剖未发现明显异常改变。研究结果表明,3 种桑叶黑茶属于无毒级食品,符合食品安全要求。

关键词 桑叶黑茶; 安全性评价; 致病菌; 重金属; 农药残留; 致死中量

中图分类号 S886.9; TS272.5 **文章编号** 0257-4799(2019)04-0555-08

Drinking Safety Evaluation of 3 Kinds of Mulberry Leaf Dark Tea

Shao Yuanyuan^{1,2,3} Yan Xinpei^{1*} Li Feiming¹ Xiao Jianzhong¹ Zou Xiangyue¹ Li Xia¹ Ye Tianmei¹

(¹ Sericultural Research Institute of Hunan Province, Changsha 410127, China; ² Key Laboratory of Tea Science, Ministry of Education, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; ³ Hunan Co-Innovation Center for Utilization of Botanical Functional Ingredients, Changsha 410128, China)

Abstract Taking 3 kinds of mulberry leaf dark tea Fuzhuan, Qianliang and Tianjian as research objects, their residues of pathogenic bacteria, heavy metals and pesticide were detected in accordance to the national food safety standards, and acute toxicity test was performed in line with the food safety toxicological evaluation procedure to ensure the drinking safety of mulberry leaf dark tea. The results showed that there was no pathogenic bacteria in the samples of mulberry leaf dark tea Fuzhuan, Qianliang and Tianjian. Moreover, content of heavy metals such as lead, cadmium, mercury and arsenic was far below agricultural standards for tea, and no pesticide residue was detected, which met the national standards for contaminant limits in food. The test on acute toxicity to mice indicated that LD₅₀ of mulberry leaf dark tea Fuzhuan, Qianliang and Tianjian were 22.3 g/kg, 22.8 g/kg and 28.5 g/kg, respectively, all of which were higher than non-toxic standard defined in Health Food Evaluation Technology and Specification. Besides, no significant abnormal changes were found in the viscera of mice intragastrically administrated with mulberry leaf dark tea extracts. All above results proved that mulberry leaf dark tea is non-toxic food and meets the requirements of food safety.

Keywords Mulberry leaf dark tea; Safety evaluation; Pathogenic bacteria; Heavy metal; Pesticide residue; Median lethal dose (LD₅₀)

收稿日期:2018-12-19 接受日期:2019-01-05

资助项目:湖南省重点研发计划课题(No.2015NK3054),现代农业产业技术体系建设专项(No.CARS-18)。

第一作者信息:邵元元(1987—),女,初级农艺师。

E-mail: amiliyayuan@163.com

通信作者信息:颜新培,博士,研究员。

E-mail: 776256205@qq.com

* Corresponding author. E-mail: 776256205@qq.com

桑树在我国栽培有 4 000 多年历史,广泛种植于全国各地,桑叶作为桑树的主要经济产物,每年可采摘多次,占地上部分产量的 60% 左右^[1]。在

《神农本草经》中桑叶被誉为“神仙叶”，国家卫生与健康委员会也将其作为药食同源的植物资源。桑叶既是蚕的唯一食源，也是劳动人民长期防病治病的良药。桑叶微苦、甘、寒，具有疏风散热、清肝明目的功效，常用于风热感冒、头痛咳嗽、目赤肿痛、迎风流泪等疾病治疗；桑叶中含有生物碱、黄酮、多糖、植物甾醇、氨基酸、维生素等多种功能成分，可起到降血糖、抗肿瘤、抗感染、抗氧化等保健作用^[2-3]。因桑树的种植要求不高、生物量大且具有一定的生态效益，桑叶还具有极高的药用价值，继而成为天然的物美价廉的功能性食品原料来源之一。对桑叶资源进行深入的开发与利用，是传统蚕桑产业的延伸以及为蚕农增收的途径之一。

黑茶是我国六大茶类之一，安化黑茶是湖南特有的地理标志产品，近年来安化黑茶由于降脂减肥、调理肠胃等功效符合人们健康生活的需求，畅销全国乃至全世界。基于这些优势，本研究团队利用安化黑茶传统工艺，将桑叶制作成桑叶毛茶，与茶叶毛茶复配制作新型功能性黑茶——桑叶黑茶^[4]。由于制作毛茶的桑叶原料较粗老，通过发酵和拼配之后其安全性还未知，本研究以此为切入点，对桑叶黑茶产品进行安全性评价，为桑叶黑茶的安全饮用提供科学理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂和仪器

1.1.1 桑叶黑茶样品 桑叶茯砖(FZ)T-1、桑叶千两(QL)T-2、桑叶天尖(TJ)T-3均由安化云天阁茶业有限公司提供。桑叶茯砖压制经过原料筛分、拼配、渥堆、压制、定型、发花干燥、成品包装等工序。桑叶千两采用纯手工制作工艺，其加工程序为选料、筛分、拣剔、紧压成型、晾至干燥。桑叶天尖制作经过原料拼配、筛分、风选、拣剔、高温汽蒸软化、烘培、拼堆、包装灌篓、压制定型、插丝透气、凉置、成品包装等工序。

1.1.2 实验小鼠 SPF级ICR小鼠160只，雌雄各半，体质量18.0~22.9g，由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供，实验动物生产许可证号SCXK(湘)2013-0004，实验动物使用许可证号SYXK(湘)2015-0016，实验动物质量合格证号No.43004700032173。SPF鼠料为全价颗粒饲料，由北京科澳协力饲料有限公司生产，经⁶⁰Co消毒，符合GB 14924.2—2001、

GB 14924.3—2010等饲料行业国家标准。

1.1.3 实验试剂 氯化钠、氢氧化钠、盐酸、葡萄糖、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠(AR)等为国药集团化学试剂有限公司产品；酵母浸膏(BR)为国药集团化学试剂有限公司产品；琼脂为Biosharp公司产品；胰蛋白胨、蛋白胨、牛胆盐购自北京澳博星生物技术有限责任公司；牛肉膏(BR)、乳糖(AR)购自上海展云化工有限公司。

1.1.4 实验仪器 Alpha 1-4/LSC Plus真空冷冻干燥仪(德国Christ公司)，C22-RT2240电磁炉(广东美的生活电器制造有限公司)，GIPP-13均质器(上海继谱电子科技有限公司)，ABI04-N电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)，7890A FPD气相色谱仪、Agilent 7800电感耦合等离子体质谱仪[安捷伦科技(中国)有限公司]。

1.2 桑叶黑茶提取物干粉的制备

第1次提取，茶水比1:10，沸水保温30min，过滤；第2次提取，茶水比1:5，沸水保温20min，再过滤；然后合并2次的滤液，旋转浓缩，冷冻干燥成粉末，备用。

1.3 桑叶黑茶提取物的微生物检测

菌落总数测定采用平板法，参照GB 4789.2—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》^[5]；大肠菌群计数采用平板法，参照GB 4789.3—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数》^[6]；金黄色葡萄球菌分析采用平板法，参照GB 4789.10—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》^[7]；沙门氏菌分析采用平板法，参照GB 4789.4—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验沙门氏菌检验》^[8]。

1.4 桑叶黑茶提取物的重金属残留检测

重金属铅、镉、汞、砷测定参照GB 5009.268—2016《食品安全国家标准 食品中多元素的测定》^[9]。

1.5 桑叶黑茶提取物的农药残留检测

参照GB/T 5009.110—2003《植物性食品中氯氰菊酯、氰戊菊酯和溴氰菊酯残留量的测定》^[10]、GB/T 5009.20—2003《食品中有机磷农药残留量的测定》^[11]、GB/T 5009.19—2008《食品中有机氯农药多组分残留量的测定》^[12]进行农药氯氰菊酯、溴氰菊酯、氰戊菊酯、六六六、滴滴涕、敌敌畏的残留检测。

1.6 桑叶黑茶提取物的急性经口毒性试验

按照国家卫生与健康委员会发布的《食品安全性毒理学评价程序和方法》^[13]和《保健食品检验与评价技术规范》^[14]的相关要求,对桑叶黑茶提取物的急性毒性进行评价。

1.6.1 动物饲养 饲养环境 SPF 级,温度 20~26 °C,相对湿度 40%~70%,换气次数 ≥ 15 次/h,动物照明时间每日 12 h/12 h 交替照明,工作照度 200 lx,动物照度 15~20 lx,环境符合 GB 14925—2010 中 SPF 级实验动物环境条件的要求。

1.6.2 剂量设置 根据预试验结果,选用 ICR 小鼠 160 只,雌雄各半,体质量 18.0~22.9 g,以 42.9 g/kg 为最大剂量组,0.75 g/kg 为组间距,按体质量、性别随机分为 16 组,设 1 个空白对照组,每种黑茶样品分别设 5 个剂量组,分别为 I 组(42.9 g/kg, 0.50 g/mL)、II 组(32.6 g/kg, 0.38 g/mL)、III 组(24.9 g/kg, 0.29 g/mL)、IV 组(18.9 g/kg, 0.22 g/mL)、V 组(14.6 g/kg, 0.17 g/mL),如表 1 所示。

每组 10 只小鼠,按 20 mL/kg 经口灌胃给予蒸馏水或对应不同浓度的茶叶水提物,实验前禁食不禁水 12 h 以上,给药当日给药 1 次。

1.6.3 观测时间与观测指标 在给药后 0~4 h 内仔细观察记录各组动物的中毒表现和特点、毒性反应出现及恢复时间以及死亡情况等,然后每天观察 1 次,连续观察 14 d,观察指标包括动物外观、行为活动、分泌物、排泄物、饮食情况、死亡情况(死亡时间、濒死前反应)等。分别于给药前及给药后第 4 天、第 7 天、第 10 天和第 14 天对动物进行称量,记录动物体质量变化及死亡情况。如发现动物死亡或濒死,应按照相关标准操作流程规定及时对动物进行解剖观察。观察期结束时,对剩余的试验动物进行大体解剖,肉眼观察各主要脏器如肝脏、肾脏、脾脏、心脏、脑的颜色、形状、位置和大小等,并检查脏器表面和切面的质地,大体解剖出现异常时,均记录并对异常器官进行组织病理学检查。

表 1 试验剂量及分组

Table 1 Dosage and group division in the test

组别 Group	茶样质量浓度 /(g·mL ⁻¹) Concentration	灌胃剂量 /(g·kg ⁻¹) Dosage for gavage	灌胃体积 /(mL·kg ⁻¹) Gavage volume	每日给药次数/次 Dosages per day	动物数量/只 Number of animals	
					♂	♀
CK	—	—	20	1	5	5
FZ(T-1) I	0.17	14.6	20	1	5	5
FZ(T-1) II	0.22	18.9	20	1	5	5
FZ(T-1) III	0.29	24.9	20	1	5	5
FZ(T-1) IV	0.38	32.6	20	1	5	5
FZ(T-1) V	0.50	42.9	20	1	5	5
QL(T-2) I	0.17	14.6	20	1	5	5
QL(T-2) II	0.22	18.9	20	1	5	5
QL(T-2) III	0.29	24.9	20	1	5	5
QL(T-2) IV	0.38	32.6	20	1	5	5
QL(T-2) V	0.50	42.9	20	1	5	5
TJ(T-3) I	0.17	14.6	20	1	5	5
TJ(T-3) II	0.22	18.9	20	1	5	5
TJ(T-3) III	0.29	24.9	20	1	5	5
TJ(T-3) IV	0.38	32.6	20	1	5	5
TJ(T-3) V	0.50	42.9	20	1	5	5

FZ(T-1)—桑叶茯砖,QL(T-2)—桑叶千两,TJ(T-3)—桑叶天尖。表 2~5 同。

FZ(T-1)—Mulberry-leaf dark tea Fuzhuan, QL(T-2)—Mulberry-leaf dark tea Qianliang, TJ(T-3)—Mulberry-leaf dark tea Tianjian. The same in Table 2 to 5.

1.7 数据处理

使用 SPSS 16.0 软件进行数据统计分析,两两比较,符合正态分布时采用独立样本 t 检验,不符合正态分布时采用非参数 t 检验。 $P < 0.05$ 表示有统计学意义, $P < 0.01$ 表示所检验的差别有非常显著意义。采用 Bliss 法计算 LD_{50} 及 95% 置信区间。

2 结果与分析

2.1 桑叶黑茶样品中的微生物检测结果

样品中菌落及其致病菌的检测结果见表 2,样品中大肠菌群含量符合国家卫生标准(< 0.3 MPN/g),均没有检测到沙门氏菌和金黄色葡萄球菌。

黑茶是一种独特的微生物发酵茶,黑茶的加工过程分为初级加工和再加工阶段。黑茶初加工过程包括杀青、初揉、渥堆、复揉、干燥等工序,其中关键工序渥堆是微生物以茶叶为基质,利用自身活动产生的热量和茶叶本身的湿热作用,促使茶叶发生复杂的化学

反应,在渥堆过程中微生物不断生长繁殖^[15],微生物代谢分泌产生多酚氧化酶、纤维素酶、果胶酶等,为茶叶内含物质转化提供有效的生化动力,如氧化儿茶素、分解纤维素、水解果胶和蛋白质^[16],促进黑茶内含物质的转化,使茶汤变成棕红,共同参与黑茶品质的形成。由于黑茶中微生物比较活跃,所以菌落总数比较高。桑叶茯砖、桑叶千两和桑叶天尖三者的菌落总数有差异,可能是在再加工过程中工艺差异影响形成。根据中华人民共和国农业行业标准 NY/T 556—2001《茉莉花茶》^[17],每 100 g 茶叶大肠菌群的最大可能数(MPN)不能超过 500 个。本研究桑叶黑茶样品中大肠菌群含量小于 0.3 MPN/g,都未超过该标准。根据 GB 29921—2013《食品安全国家标准 食品中致病菌限量》^[18],饮料中沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的可接受水平限量分别为 0 和 100 CFU/g。3 种桑叶黑茶样品中都没有检测到沙门氏菌和金黄色葡萄球菌,饮用安全性较高。

表 2 3 种桑叶黑茶样品中的微生物检测结果

Table 2 Detection result of microbe in 3 kinds of mulberry leaf dark tea

样品 Sample	菌落总数 /(CFU·g ⁻¹) Total number of colonies	大肠菌群数量 /(MPN·g ⁻¹) Number of coliforms	金黄色葡萄球菌数量 /(CFU·g ⁻¹) Number of <i>Staphylococcus aureus</i>	沙门氏菌数量 /(CFU·g ⁻¹) Number of <i>Salmonella</i>
FZ(T-1)	3.8×10 ⁴	<0.3	—	—
QL(T-2)	5.7×10 ⁴	<0.3	—	—
TJ(T-3)	1.3×10 ⁴	<0.3	—	—

2.2 桑叶黑茶样品中的重金属检测结果

重金属是影响茶叶质量安全的重要问题之一,过量的重金属会影响人的正常生理机能。茶叶重金属主要来源于土壤、大气沉降或在加工过程中引入^[19]。根据农业行业标准 NY 659—2003《茶叶中铬、镉、汞、砷及氟化物限量标准》^[20],茶叶中镉、汞、砷最高限量分别为 1 mg/kg、0.3 mg/kg 和 2 mg/kg,该标准对于铅没有规定,所以根据 GB 2762—2017《食品安全国家标准 食品中污染物限量》^[21]茶叶中铅最高含量为 5.0 mg/kg。桑叶茯砖、千两和天尖 3 种桑叶黑茶的重金属检测结果见表 3。

3 种桑叶黑茶样品重金属检测结果都远低于农业标准和国家标准,满足行业标准要求,说明桑叶黑茶在重金属方面是安全的。天尖中重金属含量低于茯砖和千两,这可能是由于天尖所用原料相对较嫩为一级黑毛茶。在桑叶黑茶生产过程中,为了

减少重金属的污染,茶园和桑园选址应远离公路和工业区,减少空气沉降污染;改良茶园土壤状况,优化栽培管理技术,减少重金属富集;调整制茶设备,保持环境卫生,杜绝制茶过程污染。

表 3 3 种桑叶黑茶样品中的重金属检测结果

Table 3 Detection result of heavy metal in 3 kinds of mulberry leaf dark tea

样品或标准 Sample or standard	[质量分数 / (mg·kg ⁻¹) Mass fraction]			
	铅 Lead	镉 Cadmium	汞 Mercury	砷 Arsenic
FZ(T-1)	0.88	0.130	0.006	0.110
QL(T-2)	1.40	0.095	0.016	0.200
TJ(T-3)	0.65	0.090	0.012	0.074
NY 659—2003		1.000	0.300	2.000
GB 2762—2017	5.00	0.200	0.020	0.500

2.3 桑叶黑茶样品中的农药残留检测结果

利用药剂防治茶树病虫害已经成为茶农们的一项重要措施,然而,农药施用不当会使成品茶叶农药残留超标,进而影响茶叶品质。根据 GB 2763—2016《食品安全国家标准 食品中农药最大残

留限量》^[22],茶叶中氯氰菊酯、溴氰菊酯、氰戊菊酯、六六六、滴滴涕和敌敌畏最高限量分别为 20 mg/kg、10 mg/kg、0.1 mg/kg、0.2 mg/kg、0.2 mg/kg 和 0.1 mg/kg。由表 4 可以看出,茯砖、千两和天尖 3 种桑叶黑茶均未检测到农药残留,符合安全标准。

表 4 3 种桑叶黑茶样品中的农药残留检测结果

Table 4 Detection result of pesticide residue in 3 kinds of mulberry leaf dark tea

样品或标准 Sample or standard	(mg·kg ⁻¹)					
	氯氰菊酯 Cypermethrin	溴氰菊酯 Permethrin	氰戊菊酯 Fenvalerate	六六六 Hexachlorocyclohexane (HCH)	滴滴涕 Dichlorodiphenyl-trichloro etha (DDT)	敌敌畏 Dimethyl-dichloro-vinyl-phosphate (DDVP)
FZ(T-1)	—	—	—	—	—	—
QL(T-2)	—	—	—	—	—	—
TJ(T-3)	—	—	—	—	—	—
GB 2763—2016	20	10	0.1	0.2	0.2	0.1

2.4 桑叶黑茶的急性毒性试验结果

急性毒性试验是测定毒物的致死剂量以及其他急性毒性参数,以 LD₅₀为最主要的参数,并根据 LD₅₀值进行急性毒性分级,进一步通过观察动物中毒表现、毒作用强度和死亡情况,初步评价毒物对机体的毒效应特征、靶器官、剂量-反应关系和对人体产生损害的危险性^[23]。经口灌胃桑香茯砖、桑香千两和桑香天尖后,小鼠死亡率和 LD₅₀测定结果见表 5。由表 5 可知,桑叶茯砖对小鼠的 LD₅₀为 22.3

g/kg,95%置信区间为 19.3~25.6 g/kg;桑叶千两对小鼠的 LD₅₀为 22.8 g/kg,95%置信区间为 18.7~27.2 g/kg;桑叶天尖对小鼠的 LD₅₀为 28.5 g/kg,95%置信区间为 5.1~32.5 g/kg。GB 15193.3—2014《食品安全国家标准 急性毒性经口试验》中规定 LD₅₀>5 g/kg 属实际无毒级,《保健食品检验与评价技术规范》中规定 LD₅₀>15 g/kg 属无毒级,3 种茶样对小鼠的 LD₅₀均大于 15 g/kg,属无毒食品。

表 5 ICR 小鼠单次灌胃给予桑叶黑茶水提取物死亡情况与 LD₅₀测定结果

Table 5 Number of death and LD₅₀ results from a single intragastric administration of mulberry leaf dark tea extract to ICR mice

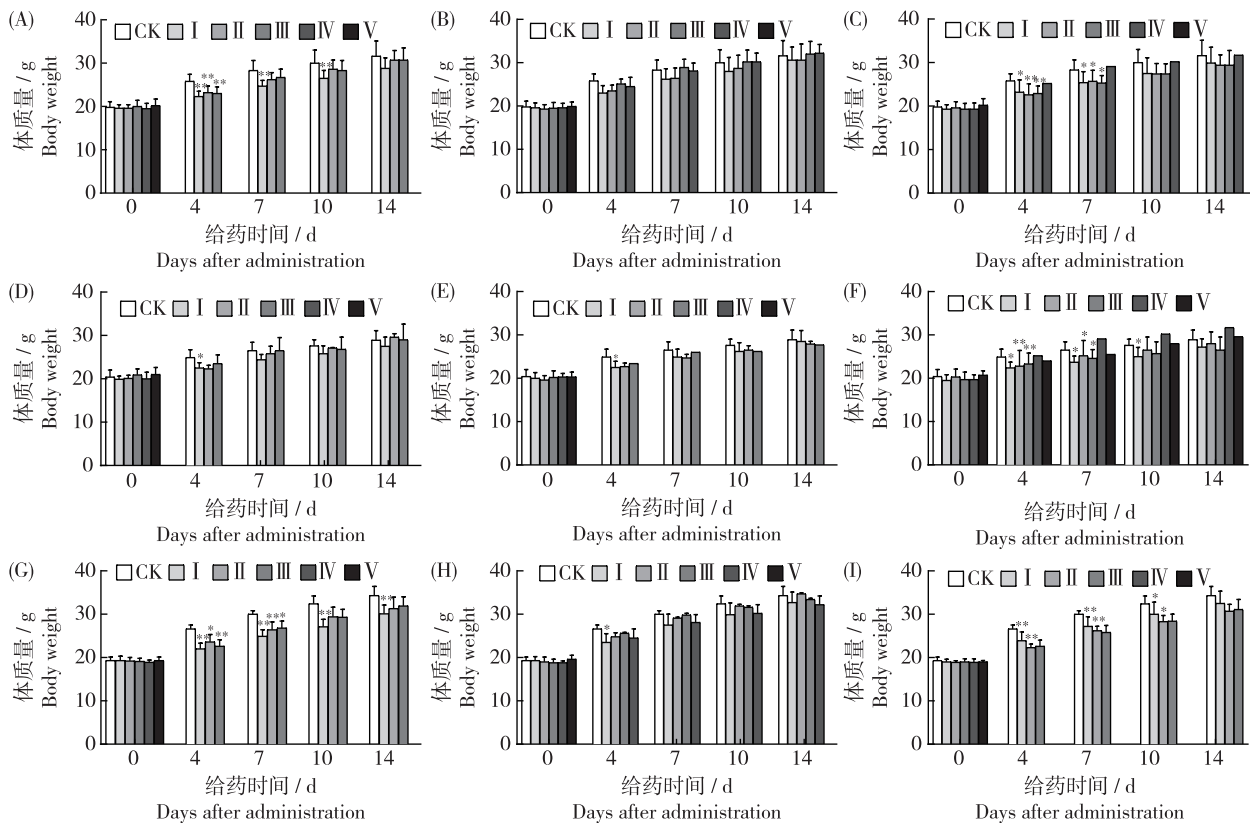
组别 ¹⁾ Group ¹⁾	剂量 / (g·kg ⁻¹) Dosage	动物数量 / 只 Number of animals	死亡数量 / 只 Number of deaths	死亡率 / % Mortality	LD ₅₀ (95%置信区间) / (g·kg ⁻¹) LD ₅₀ (95% confidence interval)
CK		10	0	0	
FZ(T-1) I	14.6	10	0	0	
FZ(T-1) II	18.9	10	4	40	
FZ(T-1) III	24.9	10	5	50	22.3(19.3~25.6)
FZ(T-1) IV	32.6	10	10	100	
FZ(T-1) V	42.9	10	10	100	
QL(T-2) I	14.6	10	0	0	
QL(T-2) II	18.9	10	5	50	
QL(T-2) III	24.9	10	6	60	22.8(18.7~27.2)
QL(T-2) IV	32.6	10	7	70	
QL(T-2) V	42.9	10	10	100	
TJ(T-3) I	14.6	10	0	0	
TJ(T-3) II	18.9	10	0	0	
TJ(T-3) III	24.9	10	2	20	28.5(25.1~32.5)
TJ(T-3) IV	32.6	10	9	90	
TJ(T-3) V	42.9	10	9	90	

¹⁾ 试验分组情况见表 1。

¹⁾ The test groups were shown in Table 1.

观察3种桑叶黑茶对小鼠生物学性能及脏器的影响,结果发现给药后0~4 h内空白对照组小鼠未见异常,给药组小鼠均出现不同程度的运动减少、倦缩等症状,不同剂量组出现不同数量小鼠死亡,给药后第2天存活的小鼠连续观察14 d未见明显异常。给药后死亡的小鼠进行大体解剖检查,肉眼观察脏器位置、大小、色泽、粘连等,并检查脏器表面和切面的质地,未见明显异常改变。试验结束后用2%戊巴比妥钠麻醉处死所有的试验小鼠,大体解剖检查脏器,也未见明显异常变化。

如图1-A、D、G所示,经口灌胃桑叶茯砖水提物, I组给药后第4天、第7天和第10天, II组给药后第4天, III组给药后第4天小鼠整体体质量相比于空白对照组显著下降($P \leq 0.01$);雌性小鼠仅 I组给药后第4天体质量相比于空白对照组显著下降($P \leq 0.05$);雄性小鼠 I组给药后第4天、第7天、第10天和第14天, II组和 III组给药后第4天和第7天的体质量相比于空白对照组显著下降($P \leq 0.01$ 或 $P \leq 0.05$)。说明本试验条件下灌胃给予桑叶茯砖水提物对雄性小鼠体质量可能具有影响。



A. 桑叶茯砖对小鼠体质量的影响 B. 桑叶千两对小鼠体质量的影响 C. 桑叶天尖对小鼠体质量的影响 D. 桑叶茯砖对雌性小鼠体质量的影响 E. 桑叶千两对雌性小鼠体质量的影响 F. 桑叶天尖对雌性小鼠体质量的影响 G. 桑叶茯砖对雄性小鼠体质量的影响 H. 桑叶天尖对雄性小鼠体质量的影响 I. 桑叶天尖对雄性小鼠体质量的影响 I~V 试验组的分组情况见表1。与空白对照组比较, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ 。

A. Effect of mulberry leaf dark tea Fuzhuan on body weight of mice B. Effect of mulberry leaf dark tea Qianliang on body weight of mice C. Effect of mulberry leaf dark tea Tianjian on body weight of mice D. Effect of mulberry leaf dark tea Fuzhuan on body weight of female mice E. Effect of mulberry leaf dark tea Qianliang on the weight of female mice F. Effect of mulberry leaf dark tea Tianjian on the weight of female mice G. Effect of mulberry leaf dark tea Fuzhuan on body weight of male mice H. Effect of mulberry leaf dark tea Qianliang on body weight of male mice I. Effect of mulberry leaf dark tea Tianjian on body weight of male mice The test group I to V were shown in Table. Compared with the control group, “*” means $P \leq 0.05$, and “**” means $P \leq 0.01$.

图1 3种桑叶黑茶对小鼠体质量的影响

Fig. 1 Effects of 3 kinds of mulberry-leaf dark tea on body weight of mice

如图1-B、E、H所示,经口灌胃桑叶千两水提取物,I组给药后第4天小鼠体质量相比于空白对照组显著下降($P \leq 0.01$);雌性小鼠仅I组给药后第4天体质量相比于空白对照组极显著下降($P \leq 0.05$);雄性小鼠I组给药后第4天体质量相比于空白对照组显著下降($P \leq 0.05$)。以上结果未见明显的剂量依赖关系,且小鼠体质量变化在正常范围内,结合大体解剖检查结果认为这一现象可能是灌胃给予大剂量高浓度药液所致,没有明显毒理学意义。

如图1-C、F、I所示,经口灌胃桑叶天尖水提取物,仅I组、II组和III组给药后第4天、第7天小鼠体质量相比于空白对照组显著下降($P \leq 0.01$ 或 $P \leq 0.05$);雌性小鼠仅I组给药后第4天、第7天和第10天的体质量相比于空白对照组显著下降($P \leq 0.05$),II组和III组给药后第4天、第7天的体质量相比于空白对照组显著下降($P \leq 0.01$ 或 $P \leq 0.05$);雄性小鼠II组和III组给药后第4天、第7天和第10天,II组和III组给药后第4天和第7天的体质量相比于空白对照组显著下降($P \leq 0.01$ 或 $P \leq 0.05$)。说明本试验条件下灌胃给予桑叶天尖水提取物对雌性和雄性小鼠的体质量可能具有影响。

3 讨论

黑茶的致病菌主要包括大肠菌群、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌等,大肠菌群是粪便污染指标菌,主要是以该菌群的检出情况来表示食品中有否粪便污染;金黄色葡萄球菌是一种病原菌,会引起许多严重的感染;沙门氏菌是一种常见的食源性致病菌,容易引起食物中毒^[24]。茶叶中重金属污染物主要来自土壤、大气沉降以及农资投入,长期饮用重金属超标的茶叶可能会造成重金属在人体内蓄积引起慢性中毒^[25]。农药残留干扰人体内分泌失调,影响免疫系统和造血系统,易导致胎儿内脏发育不全和畸形^[26]。在传统黑茶研究中,王文光等^[27]对云南省普洱茶主产区的普洱熟茶从微生物的角度进行安全性评价研究,发现均没有检测到致病菌;王秋霜等^[28]对沉香普洱茶进行安全性评价,未检测出致病菌和农药残留。本试验选取桑叶茯砖、桑叶千两和桑叶天尖3款桑叶黑茶产品进行安全性评价研究,从安全性指标分析的结果来看,本研究中的桑叶黑茶茶样中菌落总数较高,这与黑茶加工工艺

密不可分,特别是在渥堆过程中微生物大量繁殖,分泌出多种胞外酶,促进蛋白质、果胶以及纤维素的分解,形成黑茶特有的色、香、味品质特征^[29-33]。3个品种的桑叶黑茶中大肠菌群含量都很低且都没有检测到沙门氏菌和金黄色葡萄球菌。样品中铅、镉、汞和砷都远低于农业标准和食品安全国家标准,说明桑叶黑茶在重金属方面满足行业标准要求。3种桑叶黑茶均未检测出农药残留,符合食品安全国家标准。可以看出桑叶黑茶具有较高的饮用安全性。

急性毒性试验是经口一次性给与或24 h多次给与受试物后,在短期内观察动物所产生的毒性反应,包括致死的和非致死的指标参数,致死剂量通常用致死中量 LD_{50} 表示。有研究表明^[34-37],利用小鼠评价普洱茶1年散茶、5年饼茶、10年散茶和云南烘青绿茶的急性毒性,对小鼠的 LD_{50} 分别为9.7 g/kg、11.2 g/kg、12.2 g/kg、7.5 g/kg;广西六堡茶对小鼠的 LD_{50} 为9.38 g/kg;茯茶对雄性小鼠的 LD_{50} 为14.7 g/kg,对雌性小鼠的 LD_{50} 为19.6 g/kg。本试验结果显示,茯砖、千两和天尖3种桑叶黑茶对小鼠的 LD_{50} 分别为22.3、22.8和28.5 g/kg。茶叶使小鼠中毒及死亡与过高浓度的咖啡碱和茶多酚有关,而桑叶黑茶由桑叶和茶叶两部分组成,其中茶叶原料含量要低于普通黑茶,因而咖啡碱和茶多酚的含量也要低于普通黑茶,所以桑叶黑茶对小鼠的 LD_{50} 大于茯茶、普洱茶、六堡茶和绿茶。综合以上实验表明桑叶黑茶无明显毒副作用,属无毒级,也不含有毒物质,可放心饮用。在试验过程中,我们还发现桑叶黑茶对小鼠体质量有影响,灌胃桑叶黑茶水提取物后小鼠体质量增加情况与正常组相比呈现显著差异,这为我们后续研究提供了一定的基础。

参考文献 (References)

- [1] 赵丽珺,齐凤兰,瞿晓华,等.桑叶的营养保健作用及综合利用[J].中国食物与营养,2004(2):22-25
- [2] 李林,苏小军,李清明,等.桑叶在食品中的应用研究[J].食品研究与开发,2017,38(13):217-220
- [3] 欧阳臻,陈钧.桑叶的化学成分及其药理作用研究进展[J].江苏大学学报(自然科学版),2003,24(6):39-44
- [4] 李飞鸣,颜新培,龚昕,等.一种桑叶茯砖茶及其生产方法:ZL201310441068.9[P].2017-09-29
- [5] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局.食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定:GB 4789.2—2016[S].北京:中国农业出版社,2016

- [6] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局.食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数;GB 4789.3—2010[S].北京:中国农业出版社,2016
- [7] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局.食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验;GB 4789.10—2016[S].北京:中国农业出版社,2016
- [8] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局.食品安全国家标准 食品微生物学检验沙门氏菌检验;GB 4789.4—2016[S].北京:中国农业出版社,2016
- [9] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局.食品安全国家标准 食品中多元素的测定;GB 5009.268—2016[S].北京:中国农业出版社,2017
- [10] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准委员会.植物性食品中氯氰菊酯、氰戊菊酯和溴氰菊酯残留量的测定;GB/T 5009.110—2003[S].北京:中国农业出版社,2003
- [11] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局.食品中有机磷农药残留量的测定;GB 5009.268—2016[S].北京:中国农业出版社,2016
- [12] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准委员会.食品中有机氯农药多组分残留量的测定;GB/T 5009.19—2008[S].北京:中国农业出版社,2008
- [13] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.食品安全性毒理学评价程序和方法;GB 15193.1—2014[S].北京:中国标准出版社,2014
- [14] 中华人民共和国卫生部.保健食品检验与评价技术规范[S].北京:中国标准出版社,2003
- [15] 金冬双,龚淑英.黑茶的微生物作用研究进展[J].茶叶,2007,33(4):203-207
- [16] LI Q, CAI S, LI Y, et al. Biochemical components associated with microbial community shift during the pile-fermentation of primary dark tea[J/OL]. Front Microbiol, 2018, 9: 1509 [2018-12-17]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6048958/>. DOI:10.3389/fmicb.2018.01509
- [17] 中华人民共和国农业部.中华人民共和国农业行业标准 茉莉花茶;NY/T 456—2001[S].北京:中国标准出版社,2001
- [18] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.食品安全国家标准 食品中致病菌限量;GB 29921—2013[S].北京:中国标准出版社,2013
- [19] 韩宝瑜,王梦馨.试析茶叶重金属污染及其克服途径[J].安徽农学通报,2017,23(24):121-122
- [20] 中华人民共和国农业部.农业行业标准 茶叶中铬、镉、汞、砷及氟化物限量标准;NY 659—2003[S].北京:中国标准出版社,2003
- [21] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局.食品中污染物限量;GB 2762—2017[S].北京:中国标准出版社,2017
- [22] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,中华人民共和国农业部,国家食品药品监督管理总局.食品安全国家标准 食品中污染物限量标准;GB 2763—2016[S].北京:中国标准出版社,2016
- [23] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.食品安全国家标准 急性毒性经口试验;GB 15193.3—2014[S].北京:中国标准出版社,2014
- [24] 彭争光,何文斌,朱金国.湖南出口黑茶生产加工中有害微生物危害分析及控制措施研究[J].中外食品工业,2014,2(5):13-16
- [25] 王峰,单睿阳,陈玉真,等.闽中某矿区县茶园土壤和茶叶重金属含量及健康风险[J].中国环境科学,2018,38(3):1064-1072
- [26] 张飞鸽,元艳,任小荣,等.农产品重金属污染现状及检测方法[J].现代农业科技,2017,2(24):172-173;180
- [27] 王文光,袁唯,许靖逸,等.普洱茶中微生物安全性的评价[J].普洱,2012(5):86-89
- [28] 王秋霜,陈栋,卓敏.陈香普洱茶品质安全性评价与分析[J].食品研究与开发,2011,32(11):82-86
- [29] 何煜波,姜爱丽,胡文忠,等.黑茶加工工艺与保健功能研究[J].安徽农业科学,2012,40(27):13595-13597;13600
- [30] 温琼英.黑茶渥堆的微生物学研究[J].湖南农学院学报(自然科学版),1985,1(3):67-74
- [31] 文杰宇,李宗军,王远亮,等.黑茶中微生物及其相关保健功能研究进展[J].食品科学,2010,31(9):329-332
- [32] 杨抚林,邓放明,赵玲艳,等.黑茶微生物学研究进展[J].微生物学杂志,2006,26(1):81-84
- [33] 温志杰,张凌云,吴平,等.黑茶加工中微生物作用的研究[J].茶叶通讯,2010,37(2):26-29
- [34] 吴文亮,林勇,刘仲华,等.六堡茶急性和亚急性毒性安全性评价研究[J].茶叶科学,2017,37(2):173-181
- [35] 刘勤晋,陈文品,白文祥,等.普洱茶急性毒性安全性评价研究报告[J].茶叶科学,2003,23(2):141-145
- [36] 肖文军,付冬和,任国谱,等.茯茶毒理学试验报告[J].茶叶科学,2007,27(4):307-310
- [37] 陈娜,侯艳,徐昆龙,等.云南普洱茶急性毒性研究[J].云南农业大学学报(自然科学版),2008,23(2):233-237;244