

茶氨酸复合制剂安全性毒理学研究

谭俊峰, 林智*, 李靓

(中国农业科学院茶叶研究所, 国家茶产业工程技术研究中心, 浙江 杭州 310008)

摘要: 根据《保健食品检验与评价技术规范》对茶氨酸复合制剂的安全性进行评价。急性毒性实验结果表明, 制剂对雌雄小鼠的急性经口的最大耐受剂量(MTD)均大于 20g/kg。Ames 实验、小鼠骨髓微核实验、小鼠精子畸形实验 3 项致突变实验结果均为阴性; 大鼠 30d 喂养实验中, 实验动物生长情况良好, 血液学检查结果、生化学检查结果、主要脏器比及组织学检查结果与对照组相比, 均无明显差异。结果表明: 茶氨酸复合制剂无毒, 无遗传毒性, 使用安全性高。

关键词: 茶氨酸; 安全性; 急性毒性; 遗传毒性; 最大耐受量

Toxicological Studies on Compound Theanine Preparation

TAN Jun-feng, LIN Zhi*, LI Liang

(National Engineering Research Center of Tea Industry, Tea Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310008, China)

Abstract: The edible safety of theanine was investigated according to *Standard of Health Food Test and Assessment*. Acute toxicity test in mice showed that the maximum tolerance dose (MTD) was higher than 20 g/kg. All three genetic tests including Ames test, mouse bone marrow micronucleus test and mouse teratospermia test showed negative results. Thirty-day feeding test showed that physical appearance and the indices of hematology, biochemistry and organ coefficients of rats had no significant difference when compared with those in the control group. All these results suggest that compound theanine preparation is highly safe with neither acute toxicity nor genotoxicity.

Key words: theanine; edible safety; acute toxicity; genotoxicity; maximum tolerance dose

中图分类号: TS201.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)19-0262-06

茶氨酸(L-Theanine)是茶叶中含有的一种特殊氨基酸, 茶氨酸在化学构造上与脑内活性物质谷酰胺、谷氨酸相似, 是茶叶中生津润甜的主要成分。近年来, 由于茶氨酸在抑制由咖啡因引起的兴奋^[1]、抗衰老^[2]、舒缓神经紧张^[3-4]、抗病毒^[5]、提高记忆力^[6]、延缓运动性疲劳^[7]、防治老年痴呆^[8-9]、改善睡眠^[10]等方面的作用相继被报道, 引起了国内外学者的广泛关注。

一般来说, 茶叶中的咖啡因含量多于咖啡和可可, 但茶氨酸的存在使人们在饮茶时享受到一种咖啡和可可所没有的心旷神怡的感觉。Juneja 等^[11]在观察茶氨酸对青年女性的脑电波影响时发现, 口服茶氨酸 40min 后 α 波有明显增大趋势, 但在同一实验条件下他们没有发现茶氨酸对睡眠优势的 θ 波的影响。随后的研究认为服用

茶氨酸引起的旷神怡身心效果不是使人趋于睡眠, 而是具有提高注意力的作用。林雪玲等^[12]研究发现一定剂量的茶氨酸可缩短正常小鼠在复杂水迷宫内抵达终点的时间, 减少错误次数, 可延长记忆获得障碍小鼠在跳台中首次错误的出现时间, 减少错误次数。李敏等^[13]认为茶氨酸还具有延缓运动性疲劳作用, 其机制可能与茶氨酸增加脑组织中多巴胺含量, 抑制 5-羟色胺的合成和释放等效应有关。Kimura 等^[14]认为茶氨酸还能有效降低大鼠自发性高血压, 茶氨酸的降压效果可能来自于对脑内中枢神经递质 5-羟色胺分泌量的调节作用。给高血压自发性大鼠注射茶氨酸, 其舒张压、收缩压以及平均血压都下降, 降低程度与剂量有关, 但心率没有大的变化, 且对血压正常的大鼠没有降低血压的作用。此外,

收稿日期: 2011-06-20

基金项目: 国家茶叶产业技术体系茶叶加工新技术新产品研发子课题(CARS-23-09B)

作者简介: 谭俊峰(1979—), 男, 助理研究员, 硕士, 主要从事茶叶化学和茶叶加工研究。E-mail: tjfcallme@mail.tricaas.com

* 通信作者: 林智(1965—), 男, 研究员, 博士, 主要从事茶叶化学、加工和新产品开发的研究。

E-mail: linz@mail.tricaas.com

王小雪等^[15]采用负重游泳实验,观察记录小鼠游泳死亡时间,结果经口给予小鼠不同剂量的茶氨酸30d后,能明显延长小鼠负重游泳时间,减少肝糖原的消耗量,降低运动时血清尿素氮水平,对小鼠运动后血乳酸升高有明显的抑制作用,能促进运动后血乳酸的消除,表明茶氨酸具有抗疲劳作用。

基于国内外有关茶氨酸保健功效的研究结果,根据协同增效作用原理以及药食同源的选材原则,本研究以20%茶氨酸、枸杞多糖(多糖含量50%)、黄芪多糖(多糖含量50%)和黄精提取物(按液料比5:1比例提取)为主要原料开发研制了具有缓解体力疲劳和提高免疫力保健功效的茶氨酸复合制剂,并按照卫生部颁布的《保健食品检验与评价技术规范》(2003版)要求对茶氨酸复合制剂的安全性毒理学进行了评价,通过急性毒性实验、Ames实验、小鼠骨髓微核实验、小鼠精子畸形实验和30d喂养实验以测试其安全性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

茶氨酸复合片剂(样品)由杭州天诚药业有限公司提供,称取研磨后样品分别加蒸馏水稀释定容,充分混匀后作为受试样品。

蒸馏水、对硝基喹啉、甲基磺酸甲酯、2-氨基苄、1,8-二羟基蒽醌、二甲基亚砷(DMSO)、Ames实验用培养基。

1.2 动物与菌株

清洁级昆明种小鼠、SD大白鼠,雌雄各半,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。生产许可证号:SCXK(沪)2007-0005。饲养室温度:20~25℃,相对湿度:40%~70%。实验动物使用许可证号:SYXK(沪)2007-0008。小鼠饲料由苏州双狮实验动物饲料科技服务有限公司提供,登记证号:苏E饲生字(2002)006。

测试菌株:TA₉₇、TA₉₈、TA₁₀₀、TA₁₀₂由美国加利福尼亚大学生物化学系提供,主平板分离单菌落,鉴定菌落生物学特性,符合生物学特性的菌落,扩增,液氮保存。工作用的增菌液,取2008年6月液氮保存菌株,推主平板,挑取单个菌落,接种于15mL的肉汤培养液,37℃振荡(120次/min)培养12h。

S₉的诱导和制备:多氯联苯诱导成年SD大鼠肝S₉组织,按上海市疾病预防控制中心Ames实验SOP(SCDC/ZY(xz)S234-2006)进行,2010年9月测定蛋白质含量为40.6mg/mL。

1.3 仪器与设备

ACS-3A电子秤 上海友声公司;GNP-9270型隔水式恒温培养箱 苏州江东精密仪器有限公司;显微镜 日本Olympus公司;Bp-3100s分析天平 萨多利斯公司;

CL8000全自动生化仪 日本岛津公司;CD3700血液分析仪 美国Cell-DYN公司;Mikro-22台式离心机 德国Hettich公司;HM340E切片机、HMP110脱水机、AP280包埋机、HMS70染色机 德国蔡司公司。

1.4 方法

1.4.1 急性毒性实验

动物禁食(不禁水)16h后,按体质量要求选用雌、雄小鼠各10只,分放于两鼠笼内,同性别小鼠之间体质量之差不超过3g。小鼠逐只称质量,采用最大耐受剂量法将受试样品对实验动物经口灌胃染毒,灌胃容量按每次0.4mL/20g体质量计,在24h内2次对小鼠灌胃,灌胃间隔时间为6h。染毒后,观察动物的一般状态、体质量变化、中毒症状和死亡情况等,观察期为2周。实验末再次对动物称质量。对死亡动物及到期处死动物进行尸体解剖,肉眼观察大体病理改变情况。实验全过程及观察内容均做详细记录,按最大耐受剂量法实验结果求得小鼠急性经口最大耐受剂量(MTD)。

1.4.2 微核实验

将动物随机分为5组,每组10只,雌雄各半,分别作为样品3个剂量组(10000、5000、2500mg/kg)及蒸馏水阴性对照组和环磷酰胺阳性对照组。采用30h两次灌胃法,动物称质量,将配制的不同质量浓度样品按0.4mL/20g体质量,分别对各组动物灌胃。于第2次灌胃后6h,颈椎脱臼处死动物,取股骨骨髓加小牛血清混匀,常规涂片、固定,Giemsa染色制片。镜检观察,每鼠计数1000个嗜多染红细胞(PCE)的微核数,微核率以千分率表示,在计数嗜多染红细胞(计数200个PCE)时同时计数成熟红细胞(NCE)数,并计算PCE/NCE值。

1.4.3 精子畸形实验

将动物随机分为5组,每组5只,分别作为样品3个剂量组(10000、5000、2500mg/kg)及植物油阴性对照组和环磷酰胺阳性对照组。动物称质量后,将配制的不同质量浓度样品按0.4mL/20g,分别对各组动物灌胃。每日1次,连续5d。于首次给样后第35天,颈椎脱臼处死动物,取二侧副睾放入生理盐水中,剪碎,4层过滤,取滤液涂片,固定,2%伊红染色制片。镜检观察,每鼠计数1000个精子的畸形数,计算精子畸形发生率。

1.4.4 Ames实验

1.4.4.1 预备实验

剂量选择:称取粉碎样品500mg,加蒸馏水至10mL得50mg/mL溶液,其他质量浓度按1:2稀释,吸取上述质量浓度溶液2mL,加溶剂4mL,得16.6、5.5、1.8mg/mL溶液,吸取2mL 45℃顶层培养基,加入0.1mL溶液、0.1mL TA₁₀₀菌株增菌液,需活化时加入

0.5mL S₉ 混合液, 充分混匀迅速倾倒入底层平板。37℃培养 48h, 计回复菌落数, 显微镜下观察背景菌落特性(密度、大小)和琼脂中样品溶解性。

1.4.4.2 致突变性实验

依据上述预备实验结果, 致突变性实验最高剂量选择 5mg/皿, 以下设 4 个剂量组, 每个剂量组做 3 个平行对照, 选用平板掺入法, 在加用和不加用 S₉ 条件下, 检测受试物致突变性。

样品配制: 实验当日, 称取粉碎样品 1g, 加蒸馏水至 20mL, 得 50mg/mL 溶液, 作为最高剂量组受试物溶液, 其余剂量按 1:2 稀释, 吸取前一剂量组溶液 3mL, 加溶剂 6mL 混匀, 作为后一剂量组溶液, 依次取得 16.6、5.5、1.8、0.6mg/mL 受试物溶液。测试剂量分别为: 0.06、0.18、0.55、1.66、5mg/皿。

溶剂对照: 溶剂 0.1mL/皿。

阳性对照: -S₉: TA₉₇: 2-甲氧基-6-氯代-9-(3-(2-氯乙基)氨基丙胺)吡啶-2-盐酸(ICR-19¹)(1μg/皿), TA₉₈ 对硝基喹啉(200μg/皿), TA₁₀₀、TA₁₀₂: 甲基磺酸甲酯(1μL/皿)。

+S₉: TA₉₇、TA₉₈、TA₁₀₀: 2-氨基芴(10μg/皿), TA₁₀₂: 1,8-二羟基蒽醌(50μg/皿)。

以上阳性对照均用二甲基亚砜(DMSO)作溶剂。

实验方法: 按《保健食品检验与评价技术规范》(2003年版)中鼠伤寒沙门氏菌/哺乳动物微粒体酶实验中平板掺入法, 吸取 2mL、45℃顶层培养基, 加入 0.1mL 受试物、0.1mL 菌株增菌液, 需活化时加入 0.5mL S₉ 混合液, 充分混匀迅速倾倒入底层平板, 做 3 个平行平板。37℃培养 48h, 计回复菌落数。实验重复一次。

1.4.5 30d 喂养实验

剂量设计: 样品人体推荐剂量为 1.4g/(kg·d)。本实验设低、中、高 3 个剂量, 即 0.58、1.17、2.33 g/(kg·d), 相当于人体推荐剂量的 25、50、100 倍, 另设空白对照组。

样品的处理及配制: 根据本实验剂量设计要求及动物饲料摄入情况(约 10g/(100g·d), 以体质量计), 分别将粉碎样品 87、175、350g 掺入饲料至 15kg, 拌匀, 经饲料机制成颗粒饲料, 即成低、中、高 3 种不同样品含量的饲料, 分别给 3 组动物喂饲。空白对照组给予不含样品的同种饲料。

实验方法: 将动物随机分为 4 组, 每组 20 只, 雌雄各半, 分别作为样品 3 个剂量组及空白对照组, 单笼喂养, 自由饮食, 连续喂养 30d。实验开始及实验后每周称量一次动物体质量, 并 1 周 2 次记录饲料摄入量, 计算每周及总的食物利用率。连续喂养 30d 后, 禁食, 次日逐只称质量, 取鼠血进行血液学、生化学检查, 处死, 大体解剖肉眼观察有无明显病变, 取肝、肾、脾、性器官等脏器进行称质量。计算脏体比, 并对肝、肾、脾、胃肠、性器官等脏器进行组织病理学检查。

2 结果与分析

2.1 急性毒性实验

表 1 茶氨酸复合制剂雌雄小鼠急性经口毒性实验结果

Table 1 Acute toxicity test results of compound theanine preparation in mice

动物性别	剂量/(g/kg)	动物数	死亡数	MTD/(g/kg)
雌性	20	10	0	> 20
雄性	20	10	0	> 20

由表 1 可见, 实验期间各组动物活动正常, 毛色正常, 未见任何中毒症状和死亡。到期处死动物, 解剖后肉眼观察各脏器情况, 未见异常。雌、雄小鼠急性经口最大耐受剂量(MTD)均大于 20g/kg。结果表明, 茶氨酸复合制剂属实际无毒级。

2.2 遗传毒性实验

2.2.1 微核实验

表 2 茶氨酸复合制剂对动物骨髓嗜多染红细胞微核发生率的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 2 Effect of compound theanine preparation on marrow micronucleus rate in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

剂量/(mg/kg)	性别	受检细胞数	微核细胞数	PCE/NCE	微核率/%	微核率 P 值
10000	雄性	5000	4	1.07 ± 0.05	0.8 ± 0.45	> 0.05
	雌性	5000	5	1.08 ± 0.05	1.0 ± 0.71	> 0.05
5000	雄性	5000	6	1.06 ± 0.04	1.2 ± 0.45	> 0.0
	雌性	5000	3	1.08 ± 0.05	0.6 ± 0.55	> 0.05
2500	雄性	5000	4	1.07 ± 0.06	0.8 ± 0.45	> 0.05
	雌性	5000	5	1.07 ± 0.04	1.0 ± 0.71	> 0.05
阴性对照 (蒸馏水 20000mg/kg)	雄性	5000	5	1.06 ± 0.04	1.0 ± 0.71	
	雌性	5000	6	1.07 ± 0.04	1.2 ± 0.45	
阳性对照 (环磷酰胺 40mg/kg)	雄性	5000	127	0.99 ± 0.12	25.4 ± 2.97	< 0.01
	雌性	5000	126	0.99 ± 0.10	25.0 ± 3.94	< 0.01

注: *.为与阴性对照组相比, 有显著性差异($P < 0.01$)。

表 3 茶氨酸复合制剂对动物精子畸形发生率的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)Table 3 Effect of compound theanine preparation on sperm abnormality rate in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别		受检精	畸形类型数							畸变精子数	畸变率 /%	P 值
			无钩	香蕉形	胖头	无定形	尾折	叠双头	双尾			
剂量组	10000mg/kg	5000	1	0	0	51	0	0	0	52	10.4 ± 3.8	> 0.05
	5000mg/kg	5000	1	0	1	52	0	0	0	54	10.8 ± 1.6	> 0.05
	2500mg/kg	5000	1	0	0	49	0	0	0	50	10.0 ± 2.2	> 0.05
阴性对照组 (蒸馏水 20000mg/kg)		5000	0	0	1	51	0	0	0	52	10.4 ± 4.3	
阳性对照组 (环磷酰胺 40mg/kg)		5000	7	25	34	196	2	1	2	267	53.4 ± 4.3	< 0.01

表 4 茶氨酸复合制剂 Ames 实验结果($\bar{x} \pm s$)Table 4 Ames test results of compound theanine preparation ($\bar{x} \pm s$)

组别		回复菌落数/(个/皿)							
		TA ₉₇		TA ₉₈		TA ₁₀₀		TA ₁₀₂	
		－ S ₉	＋ S ₉	－ S ₉	＋ S ₉	－ S ₉	＋ S ₉	－ S ₉	＋ S ₉
剂量组	0.06mg/ 皿	174 ± 7	178 ± 11	47 ± 4	48 ± 3	182 ± 6	194 ± 40	252 ± 15	244 ± 10
	0.18mg/ 皿	163 ± 9	183 ± 9	48 ± 8	46 ± 4	187 ± 6	177 ± 6	232 ± 7	235 ± 12
	0.55mg/ 皿	179 ± 7	183 ± 14	47 ± 3	50 ± 2	201 ± 13	179 ± 12	252 ± 9	256 ± 6
	1.66mg/ 皿	182 ± 12	179 ± 6	46 ± 5	47 ± 4	184 ± 10	186 ± 7	241 ± 6	253 ± 14
	5.00mg/ 皿	175 ± 8	184 ± 11	38 ± 3	45 ± 2	168 ± 7	181 ± 8	43 ± 7	244 ± 7
	空白对照组	179 ± 4	177 ± 11	41 ± 8	38 ± 6	174 ± 9	187 ± 6	243 ± 19	244 ± 8
	溶剂对照组	180 ± 7	190 ± 6	37 ± 5	41 ± 2	182 ± 4	183 ± 12	272 ± 11	276 ± 12
	ICR/(1μg/ 皿)	1206 ± 153							
	对硝基喹啉/(200μg/ 皿)	1450 ± 115							
	甲基甲烷磺酸酯/(1μL/ 皿)	2342 ± 97 3478 ± 174							
	2-氨基苄/(10μg/ 皿)	1439 ± 114		4228 ± 165		2577 ± 154			
	1, 8- 二羟基蒽醌/(50μg/ 皿)	1193 ± 148							

由表 2 可见, 微核实验动物组在各实验剂量下, 嗜多染红细胞(PCE)微核出现率、PCE/ NCE 与阴性对照组的差异均无显著性, 而阳性对照组显示强烈的致突变作用。结果表明, 茶氨酸复合制剂在各剂量条件下未见致突变作用。

2.2.2 精子畸形实验

由表 3 可知, 阴性对照组的精子畸形率为 1.04%, 阳性对照组的精子畸形率为 5.34%, 与阴性对照组差异具有显著性。而 3 个剂量组的精子畸形率分别为 1.04%、1.08%、1.00%, 与阴性对照组相比无显著性差异。结果表明, 茶氨酸复合制剂对小鼠精子未见遗传毒性。

2.2.3 Ames 实验

在 Ames 实验中, 受试物从每皿 0.06mg 至 5.00mg, 加与不加 S₉ 活化系统平板掺入法检测的回复菌落数均小于溶剂对照的 2 倍, 未呈现剂量反应关系, 因此样品 Ames 实验结果为阴性 (表 4)。根据 Ames 实验判断标准, 茶氨酸复合制剂未见致突变作用。

2.3 30d 喂养实验结果

2.3.1 对大鼠体质量、总食物利用率的影响

不同剂量组用茶氨酸复合制剂喂食大鼠 30d 后, 大鼠毛发正常, 无异常行为, 无死亡。各剂量组体质量、食物利用率与空白对照组比较都无显著差异 (表 5)。

表 5 茶氨酸复合制剂对大鼠总食物利用率的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)Table 5 Effect of compound theanine preparation on food utilization rate in rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

性 别	剂量/(g/ (kg · d))	体质量增 加量/g	进食 量/g	食物利 用率/%
雄性	空白对照组	213.1 $\pm$ 43.0	601.3 $\pm$ 115.6	35.3 $\pm$ 1.1
	0.58	197.2 $\pm$ 41.6	539.9 $\pm$ 112.5	36.6 $\pm$ 1.7
	1.17	228.7 $\pm$ 39.8	665.1 $\pm$ 87.0	34.2 $\pm$ 2.1
	2.33	226.2 $\pm$ 33.5	653.5 $\pm$ 90.9	34.6 $\pm$ 2.1
雌性	空白对照组	127.4 $\pm$ 15.2	511.9 $\pm$ 61.9	24.9 $\pm$ 1.2
	0.58	133.9 $\pm$ 19.7	570.2 $\pm$ 94.6	23.7 $\pm$ 1.4
	1.17	127.7 $\pm$ 22.8	495.4 $\pm$ 75.8	25.7 $\pm$ 1.8
	2.33	124.2 $\pm$ 25.0	474.6 $\pm$ 71.8	26.0 $\pm$ 1.9

2.3.2 茶氨酸复合制剂对大鼠脏器质量及大鼠脏体比值的影响

表6 茶氨酸复合制剂对大鼠脏器质量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 6 Effect of compound theanine preparation on organ weights in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

性别	剂量/(g/(kg·d))	肝质量/g	肝质量/体质量/%	肾质量/g	肾质量/体质量/%	脾质量/g	脾质量/体质量/%	睾丸或卵巢质量/g	睾丸或卵巢质量/体质量/%
雄性	空白对照组	11.80 ± 0.79	4.29 ± 0.89	2.51 ± 0.09	0.92 ± 0.19	0.98 ± 0.07	0.36 ± 0.08	3.34 ± 0.11	1.21 ± 0.23
	0.58	11.70 ± 0.64	4.53 ± 0.83	2.50 ± 0.12	0.96 ± 0.16	0.99 ± 0.07	0.38 ± 0.07	1.28 ± 0.23	1.28 ± 0.23
	1.17	11.82 ± 0.72	4.02 ± 0.65	2.54 ± 0.12	0.86 ± 0.12	1.01 ± 0.07	0.34 ± 0.05	3.37 ± 0.11	1.15 ± 0.18
	2.33	12.07 ± 0.84	4.12 ± 0.74	2.50 ± 0.15	0.85 ± 0.11	0.98 ± 0.06	0.33 ± 0.04	3.40 ± 0.14	1.16 ± 0.17
雌性	空白对照组	7.52 ± 0.70	3.82 ± 0.42	1.71 ± 0.10	0.87 ± 0.12	0.65 ± 0.08	0.33 ± 0.05	0.15 ± 0.01	0.07 ± 0.01
	0.58	7.49 ± 0.78	3.70 ± 0.64	1.63 ± 0.12	0.80 ± 0.11	0.63 ± 0.09	0.31 ± 0.05	0.15 ± 0.01	0.07 ± 0.01
	1.17	7.60 ± 0.83	3.94 ± 0.79	1.67 ± 0.14	0.86 ± 0.15	0.62 ± 0.08	0.32 ± 0.08	0.14 ± 0.01	0.07 ± 0.01
	2.33	7.26 ± 0.61	3.84 ± 0.57	1.66 ± 0.11	0.88 ± 0.15	0.64 ± 0.07	0.34 ± 0.07	0.15 ± 0.01	0.08 ± 0.01

表7 茶氨酸复合制剂对大鼠血常规的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 7 Effect of compound theanine preparation on routine blood test in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

性别	剂量/(g/(kg·d))	白细胞/(10 ⁹ 个/L)	红细胞/(10 ¹² 个/L)	血红蛋白/(g/L)	淋巴细胞/%	中性粒细胞/%	白细胞分类中单核细胞/%	嗜酸性粒细胞/%	嗜碱性粒细胞/%
雄性	空白对照组	9.65 ± 2.58	7.07 ± 0.42	131 ± 10.3	80.7 ± 3.5	14.2 ± 3.7	40.2	0.7 ± 0.5	0.4 ± 0.3
	0.58	8.78 ± 2.60	7.05 ± 0.62	132 ± 5.4	79.4 ± 3.0	15.2 ± 3.1	4.4 ± 0.5	0.6 ± 0.4	0.4 ± 0.3
	1.17	10.52 ± 2.46	7.06 ± 0.61	134 ± 10.8	80.6 ± 2.5	13.6 ± 2.8	4.3 ± 0.5	0.9 ± 0.5	0.6 ± 0.3
	2.33	9.12 ± 2.43	7.05 ± 0.59	131 ± 13.4	81.4 ± 3.5	13.0 ± 3.3	4.2 ± 0.6	1.0 ± 0.4	0.4 ± 0.3
雌性	空白对照组	8.79 ± 2.76	7.10 ± 0.61	131 ± 11.4	80.3 ± 3.9	14.2 ± 3.9	4.1 ± 0.6	0.8 ± 0.5	0.6 ± 0.3
	0.58	9.46 ± 2.55	7.03 ± 0.58	131 ± 4.0	80.3 ± 3.4	14.7 ± 3.3	4.1 ± 0.7	0.4 ± 0.3	0.5 ± 0.3
	1.17	7.16 ± 2.63	7.06 ± 0.60	130 ± 9.4	79.2 ± 3.3	15.5 ± 3.3	4.1 ± 0.7	0.6 ± 0.4	0.6 ± 0.3
	2.33	8.32 ± 2.73	7.08 ± 0.53	130 ± 5.4	78.1 ± 3.3	16.5 ± 3.5	4.0 ± 0.6	0.9 ± 0.5	0.5 ± 0.3

表8 茶氨酸复合制剂对大鼠血生化的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 8 Effect of compound theanine preparation on blood biochemical indexes in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

性别	剂量/(g/(kg·d))	白蛋白含量/(g/L)	胆固醇含量/(mmol/L)	肌酐含量/(μmol/L)	天门冬氨酸转氨酶含量/(IU/L)	丙氨酸氨基转移酶/(IU/L)	葡萄糖含量/(mmol/L)	总蛋白含量/(g/L)	甘油三酯含量/(mmol/L)	含尿素氮含量/(mmol/L)
雄性	空白对照组	40.0 ± 3.6	1.74 ± 0.17	36.6 ± 3.2	134 ± 9.5	37.6 ± 4.69	6.47 ± 0.32	70.6 ± 3.94	1.07 ± 0.14	6.70 ± 0.23
	0.58	41.2 ± 3.9	1.72 ± 0.17	38.2 ± 3.8	136 ± 7.9	38.4 ± 4.64	6.52 ± 0.27	71.1 ± 4.20	1.02 ± 0.13	6.42 ± 0.27
	1.17	39.4 ± 4.0	1.71 ± 0.16	35.3 ± 6.1	126 ± 9.9	35.6 ± 4.43	6.41 ± 0.17	69.4 ± 0.30	1.11 ± 0.16	6.55 ± 0.28
	2.33	40.1 ± 3.4	1.71 ± 0.17	36.9 ± 5.6	130 ± 10.3	37.9 ± 3.26	6.44 ± 0.28	70.4 ± 3.74	1.07 ± 0.19	6.52 ± 0.26
雌性	空白对照组	40.5 ± 3.1	1.69 ± 0.14	35.3 ± 4.2	130 ± 7.9	35.8 ± 3.25	6.51 ± 0.30	70.7 ± 4.10	1.04 ± 0.15	6.45 ± 0.27
	0.58	40.3 ± 4.3	1.71 ± 0.15	39.1 ± 4.9	133 ± 7.3	38.9 ± 3.49	6.60 ± 0.41	70.4 ± 3.65	1.12 ± 0.15	6.42 ± 0.30
	1.17	38.0 ± 3.0	1.64 ± 0.17	34.3 ± 5.5	135 ± 8.4	37.4 ± 4.32	6.44 ± 0.24	68.1 ± 5.03	1.07 ± 0.18	6.58 ± 0.28
	2.33	39.8 ± 3.3	1.60 ± 0.15	37.5 ± 6.3	125 ± 10.3	33.8 ± 4.53	6.35 ± 0.26	69.5 ± 3.80	1.11 ± 0.16	6.51 ± 0.26

茶氨酸复合制剂喂食大鼠30d后,对大鼠的肝、肾、脾、睾丸和卵巢进行解剖。结果发现各剂量组的雌、雄大鼠各器官外观颜色、大小均正常,未见明显萎缩、水肿、渗出、增生等病变。显微观察结果显示,高剂量组与空白对照组相比,结果均在正常形态学范围内,未见有明显中毒性病理改变。各剂量组的肝质量/体质量、肾质量/体质量、脾质量/体质量、睾丸(卵巢)质量/体质量系数与空白对照组比较均无显著差异(表6)。

2.3.3 对大鼠血常规指标、血生化指标的影响

对大鼠血常规指标(表7)和生化指标(表8)的检查结果表明,茶氨酸复合制剂各剂量组血常规指标及生化检验

结果与空白对照组相比均无显著差异。雌、雄大鼠的对照组空白和各剂量组血液生化指标均在正常范围内,白蛋白、胆固醇、肌酐、天门冬氨酸氨基转移酶、丙氨酸氨基转移酶、葡萄糖、总蛋白、甘油三酯、尿素氮与空白对照组相比无明显异常改变。结果表明,茶氨酸复合制剂对大鼠血液生化指标无明显影响。

3 讨论

茶氨酸复合制剂是以茶氨酸、枸杞多糖、黄芪多糖和黄精提取物为主要原料的具有缓解体力疲劳和提高免疫力功效的保健食品。依照《保健食品检验与评价

技术规范》的规定,茶氨酸复合制剂的急性毒性结果须满足动物未现死亡剂量 $\geq 10\text{g/kg}$ (即涵盖人体推荐量的100倍),才能进行第2阶段毒理学研究。而茶氨酸复合制剂第1阶段急性毒性实验小鼠雌、雄两性MTD均大于 20g/kg ,因而可以进入第2阶段毒理学实验^[16-17]。

茶氨酸复合制剂第2阶段毒理学实验主要进行了遗传毒性实验和30d喂养实验。遗传毒性实验进行了Ames实验、小鼠骨髓细胞微核实验和小鼠精子畸形实验,从3个方面探讨了茶氨酸复合制剂的遗传毒性^[18],其3项实验结果均为阴性,表明茶氨酸复合制剂在实验条件下对实验动物无遗传毒性。30d喂养实验通过饲喂设定剂量的样品,观测茶氨酸复合制剂引起有害效应的作用性质、剂量及靶器官^[19]。在30d喂养实验的高、中、低3个剂量组中,茶氨酸复合制剂对雌、雄大鼠的体质量、脏体比、血常规、血液生化指标及总食物利用率均无明显影响,肝、脾、肾、睾丸和卵巢均未见明显病理组织学改变。从毒理学角度看,茶氨酸复合制剂在实验浓度条件下对人体是安全的。

上述研究表明,茶氨酸复合制剂在实验研究剂量范围内无急性毒性,无遗传毒性,长期食用对人无害,可以作为保健食品进行相关功能研究。

参考文献:

- [1] 吕毅,郭霞飞,倪捷儿,等.茶氨酸的生理作用及合成[J].茶叶科学,2003,23(1):1-5.
- [2] 刘显明,李月芬,李国平.茶氨酸对D-半乳糖衰老模型小鼠抗衰老作用的实验研究[J].创伤外科杂志,2008,10(3):257-259.
- [3] 小林加奈理.L-テアニンのヒトの脳波に及ぼす影响[J].日本农芸化学会志,1998,72:153-157.
- [4] BUKOWSKI J F, PERCIVAL S S. L-theanine intervention enhances human gamma delta T lymphocyte function[J]. Nutrition Reviews, 2008, 66 (2): 96-102.
- [5] 林智.从茶叶抗病毒的研究谈茶氨酸的生产与应用前景[J].中国茶叶,2003(3):4-5.
- [6] KAMATH A B, WANG L, DAS H, et al. Antigens in tea-beverage prime human v $\gamma 2v \delta$ 2T cell *in vitro* and *in vivo* for memory and nonmemory antibacterial cytokine responses[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, 100: 6009-6014.
- [7] 胡柏平,洪涛.茶氨酸的生理作用及与运动的关系[J].四川体育科学,2006,6(2):27-30.
- [8] 王玉芬,秦志祥,唐振山,等.茶氨酸对家兔脑缺血后IL-8和NSE及脑超微结构的影响[J].中国医师杂志,2007,9(1):4-6.
- [9] 王玉芬,李春雨,秦志祥,等.茶氨酸对脑缺血再灌注损伤保护作用的实验研究[J].中华神经医学杂志,2006,5(6):562-565.
- [10] 李靓,林智,何普明,等.茶氨酸改善小鼠睡眠状况的实验研究[J].食品科学,2009,30(15):214-216.
- [11] JUNEJA L R, CHU D C, OKUBO T, et al. L-theanine a unique amino acid of green tea and its relaxation effect in humans[J]. Trends in Food Science & Technology, 1999, 10: 199-204.
- [12] 林雪玲,程朝辉,黄才欢,等.茶氨酸对小鼠学习记忆能力的影响[J].食品科学,2004,25(5):171-173.
- [13] 李敏,沈新南,姚国英.茶氨酸延缓运动性疲劳及其作用机制研究[J].营养学报,2005,27(4):326-329.
- [14] KIMURA K, OZEKI M, JUNEJA L R, et al. L-Theanine reduces psychological and physiological stress responses[J]. Biological Psychology, 2007, 4: 39-45.
- [15] 王小雪,邱隽,宋宇,等.茶氨酸的抗疲劳作用研究[J].中国公共卫生,2002,18(3):315-317.
- [16] 王光亚.保健食品功效成分检测方法[M].北京:中国轻工业出版社,2002.
- [17] 中华人民共和国卫生部.保健食品检验与评价技术规范[M].2003年版.北京:中华人民共和国卫生部,2003:22-34.
- [18] 付立杰.现代毒理学及其应用[M].上海:上海科学技术出版社,2001.
- [19] 刘毓谷.卫生毒理学基础[M].北京:人民卫生出版社,1995.