

似或完全一致。样品中细菌经初筛及增菌后,副溶血性弧菌数量已够多,无疑能同时接种至上述三种鉴别性平板上。根据七叶甙阳性、V—P 试验阴性、蔗糖阴性,能耐受7%氯化钠,结合肉眼、镜检特征,不难理解在18—22小时内能够作出比较准确的初步诊断。

5 结 论

5.1 通过实验证明,7%的氯化钠碱性蛋白胨水为副溶血性弧菌理想的分离及初筛液。

5.2 将七叶甙、蔗糖、葡萄糖三种鉴别性平板联合起来,无1株标准副溶血性弧菌漏检,且能在18—22小时内作出比较准确的初步诊断。

5.3 改进的副溶血性弧菌分离鉴定方法从样品中检出副溶血性弧菌需时46—48小时,包括动物试验共需时间4—5天。

参 考 文 献

- [1]朱曜.食品病原微生物检验技术,1987;88—91.
- [2]Toshio Miwatani, Etal. *Vibrio Parahaemolyticus: A Causative Bacterium of Food Poisoning* Saikon Publishing Co., LTD. TOKYO, 1976; 101—104
- [3]Robert M. Twedt, Rose Mary E. Movelli. Modified Selective and Differential Isolation Medium for *vibrio parahaemolyticus*. *Applied Microbiology* / 1971; 593.
- [4]Elisabeth D., Etal. Optimal Enrichment Time For Isolation of *Vibrio Parahaemolyticus* From Seafood. *Applied and Environmental Microbiology* / 1983; 1234—1235.
- [5]J. J. Farmer, Etal. American Society for Microbiology. Washington DC. 1985; 289
- [6]Henri L. Gram Negative Bacteria of Medicacal and public Health Importance: *Toxigenicity Identification Application*. *Inserm* / 1982; 114; 185—197.

甜菊甙的慢性毒性与致癌性研究

天津医学院 李袁丽 白成江 许尔怡 商瑞明
王永明 孙浩东 侯芝艳

摘要 给360只纯系 Wistar 大鼠喂饲含0、0.2、0.6及1.2%甜菊甙的膳食24个月。在6、12、24月末由每组取雌雄各5只大鼠处死做临床化验,所有鼠均作组织病理检查。结果各实验组与对照组相比,生长、食物利用率、摄入量、一般表现、死亡率、平均寿命均无显著差别。虽然血液、生化、尿液检查中个别指标有些差别但均波动在正常范围。非肿瘤性及肿瘤性病变发生率与膳食中甜菊甙无关。大白鼠中甜菊甙最大无作用剂量本试验为1.2%相当于793.8mg/kg。建议人的每日容许摄入量为7.938mg/kg。

甜菊甙(stevioside)为植物甜叶菊(*stevia rebaudiana*)中的一种甜味成分。1899年 Moises Bertoni 将甜叶菊归类为泽兰科,1906年 Hensley 将其归为菊科。

1931年 Bride L. M. 及 Lavielle R 对甜叶菊中的甜味成分的化学结构研究后认为它是一种糖甙并得到了纯结晶称为“甜菊甙”,其

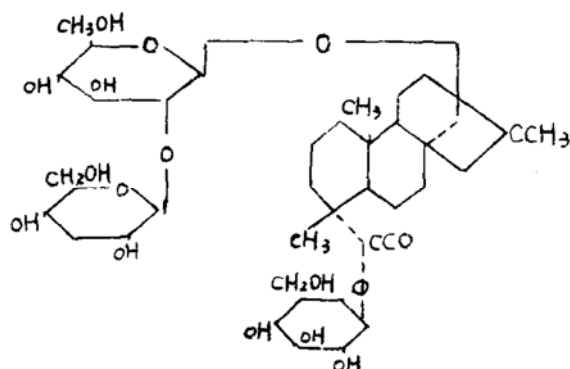
甜度为蔗糖的300倍。Gettoni 1945年就提出它可取代糖精。Wood 及 Mossetling 1955, Kohda 1976及 A Hnied 等1982对甜菊甙继续研究结果说明甜菊甙是带有一个甜菊醇(steviol)配基的糖甙,酶解时可得了摩尔D—葡萄糖和1摩尔甜菊醇。1970年日本森氏人工合成甜菊醇。甜叶菊中有甜味成分除

甜菊甙外还有丽鲍迪甙 A-E 及杜克甙 A、B 等。但甜菊甙和丽鲍迪甙 A、C 是主要的及最甜的成分。

由于甜菊甙可做为甜味剂及其药理活性引起世界关注,除日本1975年在全国种植并进入商品生产外,我国已引种成功。南开大学高分子所成功的用树脂法新工艺提取甜菊甙品质优良。本文目的是研究饲料中加入南开大学树脂法提取的甜菊甙二年对雌雄 Wistar 大鼠的慢性毒性与致癌性对长期少量摄入甜菊甙的安全性提出科学论据。

1 实验材料与方法

受试物 全部实验用甜菊甙均由南开大学甜菊糖厂提供,样品为白色料末,纯度85%,吸光度0.12,甜度为蔗糖甜度的200倍以上,结构式为:



实验动物 为天津医学院肿瘤教研室提供的纯系 Wistar 大鼠,体重60克左右,共360只。将大鼠随机分为4个组(三个实验组,一个对照组)每组90只,雌雄各半。对照组动物饲以基础饲料,各试验组分别饲以掺入0.2%、0.6%、1.2%甜菊甙粉的基础饲料24个月。动物均自由进食与饮水。动物室内装有空调维持室温在 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 左右,相对湿度约60%左右。

实验时间及基本内容:实验时间24个月,实验内容及方法均按常规法进行。

剂量与分组:我们假设①每人每日平均摄入蔗糖50克;②有50%蔗糖用甜菊甙取代;③甜菊甙甜度为蔗糖200倍;④成年男子平均体重60公斤。则 $50 \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{60} \times \frac{1}{200}$ 约得2mg/kg 天。乘以100、300、600倍安全系数则低、中、高剂量组应分别摄入200、600、1200mg/kg/日以两年实验中大白鼠平均体重为250克计,其平均饲料摄入量为25g/天则三个剂量组饲料应含的甜菊甙量分别为0.2% (2000ppm) 0.6% (6000ppm) 及 1.2% (12000ppm)除以上三个试验组外再加一对照组喂基础饲料。

2 结果

2.1 生长情况及食物利用率 经方差分析各实验组动物不论体重增长、食物摄入量及食物利用率均无显著性差别,未见甜菊甙有任何影响,见表1。动物由13个月后4组动物体重都稍有下降,第20个月后持续明显下降与衰老有关,在生长期14周平均每日摄入饲料量比成年期高故相应幼鼠摄入甜菊甙量也高于成年鼠。我们按14周生长期计算结果见表2,最高剂量组雌雄大白鼠分别摄入甜菊甙838.9mg/kg/d,748.6mg/kg/d。

2.2 一般表现及死亡情况 两年中动物无特殊中毒症状。满一年后各组大鼠冬季均有个别鼠出现喘鸣、咳嗽。但各组发生率相似,非因甜菊甙引起。各组动物自然死亡率及平均寿命经方差分析也无显著差别,见表3。动物的自然死亡多发生于实验进行12个月之后,尤其是18—24月期间主要死因为肺部感染。

2.3 尿液、血液及血液生化检查 大鼠24小时尿液用试纸法测定尿扩及蛋白,实验组及对照组无差别。血液学检查红、白细胞计数分类及血红蛋白并计算平均细胞容量(MCV),平均红细胞血红蛋白量(MCH)及平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC)。血液生

化学检验系用 Vitatron ISP-M 半自动生化分析仪测定总蛋白、白蛋白 A/G、谷丙转氨酶、谷草转氨酶碱性磷酸酶、尿素氮、胆固醇、血糖、氯、钙、磷等指标。在6、12、24月末虽各组均有个别动物以上指标有统计差别,但均波动在正常范围故认为与年龄变化有关,不属异常情况。

2.4 脏器系数 各组动物在6、12、24月末处死时对肝、肾、脾、脑、睾丸5个脏器称重计算脏器系数经方差分析无显著差别,24月末各组睾丸的脏器系数均轻度降低与衰老后睾丸轻度萎缩有关。

2.5 病理组织学检查 全部动物死亡后即立即解剖仔细进行全身检查包括皮、毛、眼、耳、鼻、口腔、阴道、生殖器、四肢、皮下脂肪、腹腔、胸腔及各脏器的肉眼检查。取肝、食道、胃、胰、肺、气管、心、骨髓、脾、淋巴结、肾、脑、垂体、甲状腺、胸腺、肾上腺、睾丸、乳腺、子宫、卵巢、膀胱21个脏器放入10%福尔马林中固定,切片, H·E 染色进行非瘤性病理分析见表4。喂甜菊甙的三组大鼠与对照组鼠各种病理变化的分布和发生频率相似,各种病变也没有剂量反应关系可说明所见病变与摄入甜菊甙无关。

2.6 肿瘤的观察与分析 实验中以首例肿瘤发生时各组存活动物数为有效动物数。各组肿瘤发生率见表5。经卡方检验,各实验组两性别的全肿瘤,恶性及良性肿瘤发生率均与对照组无显著差别。肿瘤的分类见表6。73%的肿瘤为良性肿瘤,主要为乳腺的纤维腺瘤。其中93%发生于雌性动物。

2.7 甜菊甙每日允许摄入量的推算 (ADI) 本实验经多方面分析,认为1.2%为最大无作用剂量组。由表2可知1.2%组雌雄大鼠平均摄入甜菊甙量分别为838.9mg/kg/天及748.4mg/kg/天,平均793.8mg/kg/天。此值为人可能摄入量的400倍。由动物推算到人,再除以100倍安全系数,ADI 应订为7.

938mg/kg/天,即一个60公斤体重的人每日可摄入476.28mg 甜菊甙。以喝饮料最多的儿童为最高危险人群,按平均体重20公斤计,每日可允许摄入约160mg。由本文剂量设计部分可知每人每日每公斤体重估计摄入甜菊甙量为2mg 左右,7.938mg 比之仍大约四倍,故认为食品中按上述 ADI 值加入甜菊甙是安全的。

3. 讨论 近十几年来很多人对甜菊甙的毒性进行了研究。Kurahashi 等1982经口给小鼠69%纯度的甜菊甙 $LD_{50} > 16g/kg$; Haruo Akoshi 1975经口给 DDX-N 小鼠20.4%纯度甜菊甙 LD_{50} 为17.073mg/kg 并在三个月的亚慢性毒性试验中,每日经口给雌雄大鼠甜菊甙最高剂量达3000mg/kg/天为人每日最大可能摄入量的700倍,未见不良影响; AK₁₀ Yamado 1985喂 F₃₄₄ 雌雄大鼠含甜菊甙(95.2%纯度)饲料22—24月,最高摄入量达550mg/kg/天对生长、死亡、血液、生化、病理、发瘤率等均未见不良影响。OKamura # 1978用甜菊提取物及结晶做枯草杆菌重组试验,大肠杆菌 wp₂ 和 Ames 试验均得阴性结果。中国医科大学1983做小鼠微核及睾丸染色体畸变试验亦为阴性结果。Yabu Masaaki 1977报导甜菊甙可抑制能引起龋齿的微生物如乳酸杆菌及链球菌等的生长并在 $10^{-2}M$ 浓度时可抑制右旋糖甙蔗糖酶的活性从而减少龋齿的发生。70年代初有许多人研究了甜菊甙对碳水化合物代谢的影响,如 Oveido 1970每天给25名健康成年人口服甜菊叶水浸液,服后6—8小时血糖平均降低35.2%, Suguki Hirao # 1977给大鼠含0.5%甜菊甙的高碳水化合物膳,4周后血糖由119mg/de 降至100mg/de ($p < 0.01$)。

综上所述,本文结果与文献结果一致,甜菊甙是一种高甜度、低热量、无毒、无诱变性、及不致癌的安全的天然甜味剂,并可防止因吃糖多引起的龋齿,发胖对糖尿病、肥胖病、

高血压、心脏病患者有辅助疗效,现已逐渐发展为世界第三源原。

参加本实验的还有田庆伟、沈钧老师特致谢。

表1 各组动物的食物摄入量,增重及食物利用率($\bar{X} \pm SD$)

性别	组别	鼠数	平均体重增加 (克)	摄入食物总量 (克/鼠)	食物利用率 (%)
雌	对照	10	189.0 $\pm$ 31.4	1757.6 $\pm$ 134.9	10.75 $\pm$ 1.1
	0.2%	10	186.5 $\pm$ 17.3	1805.0 $\pm$ 91.5	10.33 $\pm$ 0.6
	0.6%	10	188.9 $\pm$ 26.9	1727.3 $\pm$ 113.0	10.94 $\pm$ 1.1
	1.2%	10	189.4 $\pm$ 30.1	1744.2 $\pm$ 102.8	10.86 $\pm$ 1.4
雄	对照	10	253.4 $\pm$ 23.2	1900.8 $\pm$ 147.0	13.33 $\pm$ 0.6
	0.2%	10	258.3 $\pm$ 16.9	2061.7 $\pm$ 79.1	12.55 $\pm$ 0.5
	0.6%	10	263.4 $\pm$ 18.7	1981.7 $\pm$ 127.0	13.29 $\pm$ 0.8
	1.2%	10	257.1 $\pm$ 18.9	1994.3 $\pm$ 180.3	12.89 $\pm$ 0.7

表2 14周生长期各组动物摄入甜菊甙量

性别	组别	鼠数	总饲料摄入量 (g)	总甜菊甙摄入量 (mg)	平均体重 (g)	甜菊甙摄入量 (mg/kg/d)
雌	对照	10	17576	0	249.4	0
	0.2%	10	18050	36100	251.3	146.3
	0.6%	10	17273	103638	259.0	416.2
	1.2%	10	17442	209304	254.6	838.9
雄	对照	10	19008	0	315.4	0
	0.2%	10	20617	41234	327.4	128.5
	0.6%	10	19817	118902	330.0	367.6
	1.2%	10	19943	239316	326.0	748.8

* 计算方法举例:

$$\begin{aligned}
 & 36100\text{mg}/14(\text{w}) \times (7\text{d}/\text{w}) \times 10 \times 251.8(\text{g}) \\
 & = 36100/980 \times 251.8 \\
 & = 0.1463(\text{mg}/\text{g}/\text{d}) \times 1000 \\
 & = 146.3(\text{mg}/\text{kg}/\text{d})
 \end{aligned}$$

表3 各组动物自然死亡率和平均寿命

性别	组别	动物总数	自然死亡动物数(月)				合计	死亡率 (%)	平均寿命 (天)
			<6	6-12	12-18	18-24			
雄	对照	45	0	0	3	25	28	62.2	641.7
	0.2%	45	0	1	5	22	28	62.2	619.8
	0.6%	45	0	0	7	23	30	66.6	646.5
	1.2%	45	0	3	3	21	27	60.0	613.8
雌	对照	45	0	1	5	19	25	55.6	623.6
	0.2%	45	0	0	6	16	22	48.9	632.9
	0.6%	45	0	3	2	16	21	46.6	597.7
	1.2%	45	0	1	6	20	27	60.0	617.4

表4 各组大鼠两年实验期中非瘤性病理变化发生频率

剂量水平		对照 n=45	0.2% n=45	0.6% n=45	1.2% n=45
性别		雄 雌	雄 雌	雄 雌	雄 雌
器官	病理发现				
肝	微小病灶	1 0	1 0	0 0	0 0
	肝淤血	3 1	1 0	0 1	2 0
	轻度脂肪变	5 8	4 6	3 2	5 7
	肝脓肿	0 0	1 0	0 1	0 1
食道	粘膜糜烂	1 0	0 0	0 0	0 0
	食道扩张	1 2	1 1	1 0	1 1
	微小脓肿	0 0	1 0	0 0	0 0
	食道脓肿	0 1	0 0	0 0	0 1
胃	食道上端表皮样囊肿	0 1	0 0	0 0	0 1
	胃小弯溃疡	0 0	0 0	0 1	0 0
	胃出血	2 0	0 0	0 0	0 0
	胃粘膜乳头状增生	1 0	0 0	0 0	0 0
胰	微小脓肿	0 0	1 0	0 0	0 0
	慢性胸膜炎	1 0	0 0	0 0	0 0
	间质性肺炎	0 1	2 1	1 0	1 1
	小叶性肺炎	6 4	5 4	5 6	6 4
肺	肺脓肿	10 9	12 13	12 11	14 10
	肺水肿	0 0	0 0	0 0	1 0
	肺气肿	0 0	0 0	0 0	1 0
	肺淤血	2 4	3 5	3 4	6 5
气管	气管炎	1 4	2 1	1 3	3 1
	微小脓肿	0 0	1 0	0 0	0 0
	气管旁软组织脓肿	0 1	0 0	0 0	0 0
	心肌炎	1 0	2 0	2 0	1 1
心	心外血肿	0 0	0 1	1 0	0 0
		0 0	0 0	0 0	0 0
骨髓	急性感染	2 2	0 3	0 2	1 1
脾	萎缩	0 0	0 1	0 0	0 0
淋巴结	淋巴结炎	1 0	1 1	0 0	1 0
	淋巴结脓肿	0 0	0 0	0 0	1 0
肾	肾小管变性坏死	2 0	0 0	1 0	2 0
	肾脓肿	0 0	0 0	2 0	0 0
	肾淤血	1 0	0 1	1 0	2 0
	肾盂积水	0 0	0 1	0 0	0 0
脑	大脑表面轻度水肿	1 0	0 0	0 0	0 0
	小脑灶性水肿	0 1	0 0	0 0	0 0
	疣样增生(桥脑中部)	0 0	0 1	0 0	0 0
	大脑脓肿	1 0	0 0	0 0	0 0
垂体	急性化脓性垂体炎	0 1	0 0	2 0	0 1
	垂体脓肿	1 0	0 1	1 0	2 0
	垂体淤血	1 4	2 3	1 4	3 3
甲状腺	慢性淋巴细胞性甲状腺炎	1 0	0 1	0 1	0 0
胸腺		0 0	0 0	0 0	0 0
肾上腺	髓质增生	0 0	0 0	0 1	0 0
	淤血	1 1	1 1	1 2	0 2
	髓质出血	0 1	0 2	0 0	1 0
	脓肿	0 0	0 1	1 0	0 0
睾丸	萎缩	1 0	1 0	1 0	1 0
	淤血	0 0	1 0	0 0	0 0
乳腺	慢性炎性肉芽组织	0 0	0 0	0 0	1 0
	急性慢性子宫内膜炎	0 3	0 1	0 2	0 3
	慢性宫颈炎	0 0	0 1	0 1	0 1
	宫颈滞留囊肿	0 0	0 1	0 0	0 0
子宫	化脓性子宫炎	0 1	0 0	0 0	0 0
	宫颈积液	0 1	0 1	0 2	0 3
	子宫脓肿	0 4	0 3	0 2	0 3
	卵巢脓肿	0 4	0 3	0 4	0 4
卵巢	卵泡囊肿	0 2	0 1	0 1	0 1
	单纯囊肿	0 0	0 0	0 3	0 0
	卵巢淤血	0 1	0 1	0 0	0 0
膀胱	脓肿	0 2	1 0	3 0	1 0
	水肿	0 0	0 0	0 0	1 0

表5 各组动物肿瘤发生率比较

性 别	组 别	有效 动物数	良性肿瘤		恶性肿瘤		合计	全肿瘤发生率 %
			动物数	%	动物数	%		
雄	对照	45	3	6.6	0	0	3	6.6
	0.2%	45	1	2.2	0	0	1	2.2
	0.6%	45	2	4.4	0	0	2	4.4
	1.2%	45	0	0	2	4.4	2	4.4
雌	对照	45	4	8.8	1	2.2	5	11.1
	0.2%	45	4	8.8	3	6.6	7	15.5
	0.6%	45	6	13.3	1	2.2	7	15.5
	1.2%	45	4	8.8	2	4.4	6	13.3

表6 各组动物肿瘤的分类

性 质	分 类	雄 性				雌 性				合 计
		对照	0.2%	0.6%	1.2%	对照	0.2%	0.6%	1.2%	
良 性	肾淋巴管瘤	0	0	1	0	0	0	0	0	1
	口腔乳头状瘤	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	皮下硬纤维瘤	1	1	1	0	0	0	0	0	3
	乳腺纤维腺瘤	1	0	0	0	2	4	4	4	15
	第3,4脑室脉络丛乳头状瘤	0	0	0	0	1	0	0	0	1
	肠系膜海绵状毛细血管瘤	0	0	0	0	0	0	1	0	1
	乳腺腺瘤	0	0	0	0	1	0	0	0	1
	卵巢纤维瘤	0	0	0	0	0	0	1	0	1
	合 计	3	1	2	0	4	4	6	4	24
恶 性	腹膜梭形细胞型间皮瘤	0	0	0	1	0	0	0	0	1
	垂体嗜酸性腺癌	0	0	0	1	0	0	0	0	1
	垂体嫌色细胞腺癌	0	0	0	0	0	0	1	0	1
	垂体腺癌	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	直肠腺癌	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	宫颈鳞状细胞癌	0	0	0	0	0	2	0	0	2
	子宫多形性平滑肌肉瘤	0	0	0	0	1	1	0	0	2
	合 计	0	0	0	2	1	3	1	2	9